Zur Kenntnis der Formaldehyd-Gerbung des Caseins

Inauguraldissertation

der philosphischen Fakultät II der Universität Bern
zur Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Hans Hadorn

von Forst bei Thun

Buchdruckerei Gustav Grunau & Cie., Bern 1944

Zur Kenntnis der Formaldehyd-Gerbung des Caseins

Inauguraldissertation

der philosphischen Fakultät II der Universität Bern
zur Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Hans Hadorn

von Forst bei Thun

Buchdruckerei Gustav Grunau & Cie., Bern 1944

Von der philosophischen Fakultät II auf Antrag des
Herrn Prof. Dr. R. Signer angenommen

Bern, den 29. Oktober 1942.

Der Dekan

Prof. Dr. A. Alder

Die vorliegende Arbeit wurde im organisch-chemischen Institut der Universität Bern unter Leitung von Herrn Pd. Dr. Hans Nitschmann ausgeführt.

Meinem verehrten Lehrer möchte ich an dieser Stelle für seine wertvollen Ratschläge und Anregungen, sowie für das grosse Interesse, welches er meiner Arbeit entgegengebracht hat, meinen wärmsten Dank aussprechen.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Separatabdruck aus Helvetica Chimica Acta, Volumen XXVI und XXVII

Printed in Switzerland

Sonderabdruck aus
HELVETICA CHIMICA ACTA
Volumen XXVI Fasciculus Quartus.

108. Die Umsetzung des Caseins mit Formaldehyd. III. Quantitative Verfolgung der Formaldehydbindung bei der Härtung des Caseins mit wässrigem und mit gasförmigem Formaldehyd[1])

von **Hs. Nitschmann** und **H. Hadorn.**

(4. V. 43.)

Es ist seit langem bekannt, dass Eiweisstoffe Formaldehyd chemisch zu binden vermögen, und dass sie dabei in ihren Eigenschaften sehr wesentlich verändert werden. Sie verlieren u. U. ihre Löslichkeit in den bekannten Lösungsmitteln für Proteine; sofern die Eiweisstoffe an sich schon unlöslich sind, wird ihre Quellfähigkeit in Wasser usw. bedeutend herabgesetzt. Diese Begleiterscheinungen sind der Grund dafür, dass der Umsetzung mit Formaldehyd bei manchen Proteinen erhebliche praktische Bedeutung zukommt. In der Gerberei wird neben anderen Gerbmitteln auch Formaldehyd gebraucht, um den Häuten ihre grosse Quellfähigkeit in Wasser zu nehmen. Die Anwendung des Formalins als universelles Desinfektionsmittel ist lange bekannt; sie beruht darauf, dass der Formaldehyd die lebenswichtigen Proteine der betr. Mikroorganismen denaturiert. Eine interessante Anwendung findet der Formaldehyd in der Immunologie. Mit Formaldehyd vorsichtig umgesetztes Diphterietoxin verliert seine enorme Giftigkeit, regt den

[1]) II. Mitteilung: Helv. **26**, 1069 (1943).

menschlichen Organismus aber immer noch zur Bildung der auch gegen frisches Bakteriengift wirksamen Antikörper an. Galalith ist mit Formaldehyd gehärtetes Casein. Schliesslich bedienen sich alle bekannten Verfahren zur Herstellung von Kunstfasern aus Casein des Formaldehyds als Härtungsmittel. Nicht gehärtete Caseinfäden verlieren in Wasser wegen der enormen Quellung, die sie erleiden, fast alle Festigkeit. Auch ist es nicht möglich, wassernasse Caseinfäden zu trocknen, ohne dass sie gegenseitig verkleben.

Angesichts der vielseitigen Bedeutung der Reaktion zwischen Formaldehyd und Protein überrascht es, dass die Zahl der Arbeiten, welche sich eingehender mit ihr befassen, verhältnismässig klein ist[1]). Zudem erscheinen die Ergebnisse der verschiedenen Bearbeiter vielfach widersprechend und besonders die Ansichten über die bei der Formaldehydhärtung sich abspielenden Einzelreaktionen gehen auch heute noch sehr stark auseinander. Deshalb beschlossen wir vor zwei Jahren, uns an die Bearbeitung dieses Fragenkomplexes zu machen. Als Beispiel wählten wir das Casein, ein technisch besonders wichtiges Eiweiss, mit dem sich der eine von uns *(N.)* schon früher beschäftigt hatte.

Unsere erste Sorge galt der quantitativen Bestimmung des Formaldehyds in gegerbtem Casein. Ohne eine zuverlässige Methode hiefür ist es nicht möglich, etwas sicheres über die Bindungsart des Formaldehyds zu ermitteln. Es zeigte sich, dass es nur unter ganz bestimmten Bedingungen gelingt, den Formaldehyd hydrolytisch quantitativ abzuspalten und zu erfassen, was von den früheren Autoren zu wenig berücksichtigt worden ist. Eine zuverlässige Analysenvorschrift wurde von uns ausgearbeitet und mit den erforderlichen Belegen für ihre Genauigkeit mitgeteilt[2]).

Nach diesen Vorarbeiten konnten wir uns dem Studium der Formaldehydhärtung selber zuwenden. Unser Interesse galt besonders folgenden Fragen:

1) Zeitliche und quantitative Verfolgung der Formaldehydaufnahme des Caseins unter ähnlichen Bedingungen, wie sie bei der technischen Härtung vorliegen.

2) Einfluss der unter verschiedenen Bedingungen durchgeführten Härtung des Caseins auf dessen Wasserbindungsvermögen und Quellfähigkeit.

3) Mit welchen Gruppen im Casein reagiert der Formaldehyd und wie? Bewirkt er tatsächlich hauptvalenzmässige Verknüpfungen der Proteinmolekeln, wie von vielen Autoren angenommen, aber nie bewiesen worden ist?

In der III. und IV. Mitteilung geben wir eine Reihe von Versuchsergebnissen zu den ersten zwei Fragen wieder, wobei wir uns bewusst sind, dass dieselben noch in verschiedener Hinsicht ergänzt werden müssen. Mit der Bindungsart des Formaldehyds werden wir uns in einer später an gleicher Stelle erscheinenden Publikation befassen.

[1]) Wir werden auf diese Arbeiten erst an den geeigneten Stellen in unseren Mitteilungen eingehen.

[2]) *Hs. Nitschmann* und *H. Hadorn*, Helv. **24**, 237 (1941); **26**, 1069 (1943).

I. Die Gerbung mit wässriger Formaldehydlösung.

Es ist bekannt, dass die Formaldehydaufnahme der Proteine vom p_H abhängig ist. Bei höherem p_H wird mehr Formaldehyd gebunden als bei tiefem. Bei den nachfolgenden Gerbungen, welche auch die Präparate für die Quellungsmessungen abgaben, wurde stets beim gleichen p_H gearbeitet. Reinstes Casein wurde ganz einfach mit wässriger Formaldehydlösung bekannter Konzentration übergossen. Es stellt sich dann stets ein p_H von 4,7—5 ein, was ungefähr dem isoelektrischen Punkt des Caseins entspricht. Der Grund, warum wir dieses einfache Vorgehen wählten und nicht in Pufferlösungen arbeiteten, war vor allem der, dass das Caseingel sich so wohl am ehesten im gleichen elektrochemischen Zustand befindet, wie bei der nachfolgend zu behandelnden Gasgerbung, wo das trockene Casein nur den Dämpfen einer Formaldehydlösung ausgesetzt wird.

Die Gerbungen wurden im einzelnen wie folgt ausgeführt:

Wir verwendeten dreimal umgefälltes, sehr sorgfältig ausgewaschenes und durch Ätherextraktion von Fett befreites Säurecasein, und zwar teils käufliches Casein nach *Hammarsten* der Fa. *Merck*, teils ein von uns selber aus Magermilch hergestelltes Präparat[1]). Das Säureverbindungsvermögen der beiden Präparate war praktisch gleich, was in diesem Zusammenhang besonders wichtig ist:

Casein *Merck* $= 75{,}3 \times 10^{-5}$ Mol H'/g
eigenes Präparat $= 76{,}3 \times 10^{-5}$ Mol H'/g[2]).

Während das Casein von *Merck* staubfein gemahlen war, war unser Präparat mehr griessförmig, wobei allerdings die einzelnen Körner weiss und porös erschienen.

Proben von je 10 g Casein wurden in einem verschlossenen Kolben mit einem vielfachen Überschuss der betr. Formaldehydlösung übergossen, so dass die Konzentrationsabnahme durch die Umsetzung mit dem Casein unwesentlich war[3]).

Die Gerbproben wurden bei Zimmertemperatur und nicht in einem Thermostaten aufbewahrt, da es uns nicht darum zu tun war, exakte Reaktionsgeschwindigkeitsmessungen zu machen. Immerhin hatten die Ansätze einer Versuchsreihe unter sich alle die gleichen

[1]) Beim Umfällen desselben hatten wir Salzsäure statt Essigsäure wie *Hammarsten* gebraucht. Arbeitsweise sonst gleich. Beim Lösen wurde p_H 8 nie überschritten. Für die Extraktion mit Äther (12 Std.) wurde aus dem feuchten Produkt zuerst das Wasser durch Alkohol verdrängt.

[2]) Über diese Messungen wird später berichtet.

[3]) Im ungünstigsten Falle, bei 0,2-proz. Formaldehydlösung, wurden 220 cm^3 zugesetzt, entsprechend 0,44 g Formaldehyd. Wie aus Fig. 1 hervorgeht, wird vom Casein aus dieser Lösung in 30 Tagen 1% Formaldehyd aufgenommen, d. h. nicht einmal ¼ der Gesamtmenge. Der betr. Punkt sowie der vorhergehende in der Kurve für 0,2-proz. Formaldehyd liegen also ein wenig zu tief. Bei den anderen Lösungen sind die übrigen Fehlerquellen grösser als die durch die Konzentrationsabnahme bedingten Ungenauigkeiten.

Temperaturbedingungen. Nach den vorgesehenen Zeiten wurden die gegerbten Caseinproben in einem Glasfiltertiegel G3 abfiltriert, mit dest. Wasser ausgewaschen und dann das Wasser aus dem feuchten Casein durch Waschen mit Alkohol verdrängt. Nach scharfem Absaugen wurde das Casein auf Filtrierpapier ausgebreitet und an der Luft trocknen gelassen.

Das Auswaschen der Proben mit Wasser stellt ein besonderes Problem dar. Es hat sich nämlich gezeigt, dass man nicht nur stunden- sondern tagelang auswaschen kann und immer noch werden kleine Mengen von Formaldehyd an das Waschwasser abgegeben. Dieser Umstand ist von früheren Autoren scheinbar nicht beachtet worden, sonst könnten z. B. *H. Bowes* und *B. Pleass*[1]) nicht einfach schreiben:

„Das gegerbte Protein wurde auf ein Filter gebracht und mit einer Lösung vom gleichen p_H wie die Gerblösung ausgewaschen."

Bekanntlich lässt sich bei sehr langer Destillation mit Wasserdampf aus gehärtetem Casein der grösste Teil des Formaldehyds abspalten und mit den Wasserdämpfen übertreiben[2]). Man hätte also denken können, dass sich bei Zimmertemperatur dieselben hydrolytischen Reaktionen abspielen wie bei 100°, nur sehr viel langsamer. Es stellte sich damit die Frage, ob einfach solange Formaldehyd an das Waschwasser abgegeben wird, als das Casein noch solchen gebunden enthält. Dies ist nicht der Fall, wie uns folgender Versuch zeigte.

Auswaschversuch.

10 g Casein wurden 64 Stunden bei Zimmertemperatur mit 50 cm³ 38-proz. Formaldehyd gegerbt. Nun wurde in einem Glasfiltertiegel ausgewaschen, so dass das Waschwasser langsam, aber kontinuierlich nachfloss. Nach ca. 5 Stunden war im abfliessenden Waschwasser mit der Probe von *Rimini* und *Shryver*[3]) kein Formaldehyd mehr nachweisbar, wohl aber, wenn man das Wasser 10 Minuten mit dem Casein in Berührung liess. Es wurde nun weiter ausgewaschen. Die Zeit, welche das Waschwasser brauchte, um vom Casein noch nachweisbare Mengen Formaldehyd aufzunehmen, nahm ständig zu. Erst nach 24 Tagen war ein Endzustand erreicht. Im Waschwasser liess sich jetzt auch nach fünftägiger Berührung mit dem Casein keine Spur von Formaldehyd mehr nachweisen. Das Casein zeigte bei der Analyse noch einen Formaldehydgehalt von 1,78%; dieser ist also durch kaltes Wasser auch bei noch so langer Einwirkung nicht zu entfernen.

Es ist klar, dass derjenige Formaldehyd, der erst im Laufe vieler Tage ganz langsam abgegeben wird, nicht frei oder bloss absorbiert im Caseingel sein konnte. Das Auswaschen müsste sonst viel schneller

[1]) J. Int. Soc. Leather Trades Chem. **23**, 365—85 (1939).

[2]) Wir führten selbst eine Destillation mit Wasserdampf an einem Casein mit einem Gehalt von 2,3% Formaldehyd aus. Nach 3 Stunden waren aus den 0,5 g Casein 89% der gesamten Formaldehydmenge übergetrieben. Das Destillat betrug 560 cm³. Es war am Schluss noch nicht frei von Formaldehyd.

[3]) Reaktion von *Rimini* und *Shryver:* Zu 10 cm³ der zu prüfenden Lösung fügt man 2 cm³ 1-proz. Phenylhydrazin-hydrochlorid- und 1 cm³ 5-proz. Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung. Nach dem Durchmischen gibt man 5 cm³ konz. Salzsäure zu. Bei Gegenwart von Formaldehyd entsteht eine fuchsinrote Färbung. Empfindlichkeit 1 : 1000000.

beendigt sein. Mit Kaliumrhodanid getränktes Casein beispielsweise liess sich in wenigen Stunden vollständig auswaschen, so dass das Waschwasser mit Fe(III)-Ionen keine Spur von Rotfärbung mehr ergab. Man muss also annehmen, dass sich ein Teil des gebundenen Formaldehyds in besonders lockerer Bindung befindet, die schon bei Zimmertemperatur durch Wasser langsam gespalten wird. Wir kommen auf diese Frage in einer späteren Publikation zurück. Der Prozess des blossen Auswaschens geht allmählich in den der Abspaltung der locker gebundenen Anteile über, und man muss sich deshalb fragen, wie weit man die Behandlung mit Waschwasser treiben will. Das vollständig erschöpfende Auswaschen, wie es beschrieben wurde, ist ausserordentlich zeitraubend; zudem gehen gegen Schluss nur noch sehr geringe Mengen Formaldehyd ab. Wir haben alle unsere Gerbproben, bei denen nichts anderes vermerkt wird, solange ausgewaschen, bis das Waschwasser nach einstündiger Berührung mit dem Casein keine positive Reaktion nach *Rimini* und *Shryver* mehr gab. Wir bezeichnen solche Präparate im folgenden als „normal" ausgewaschen. Um diesen Zustand zu erreichen, musste immerhin je nach Art der Gerbung bis zu 12 Tage ausgewaschen werden.

Der Mengenanteil des chemisch gebundenen, aber durch Wasser abspaltbaren Formaldehyds scheint nicht unbeträchtlich zu sein. Eine ungefähre Vorstellung davon vermittelt folgender Versuch:

Eine Caseinprobe, die 24 Stunden mit 38-proz. Formaldehyd gegerbt worden war, wurde 1½ Stunden kontinuierlich mit dest. Wasser ausgewaschen. Nach dieser Zeit dürfte ein blosses Auswaschen ungefähr beendet sein. Die Hälfte des Präparates (38 Ia) wurde getrocknet, die andere Hälfte (38 I) wurde nun „normal" ausgewaschen, was 12 Tage in Anspruch nahm. Die Analyse der Präparate ergab folgende Werte:

38 Ia = 2,59% CH_2O
38 I = 1,91% CH_2O

Differenz = 0,68% CH_2O = 35,6% des fest gebundenen Anteiles.

Diese Zahlen zeigen sehr deutlich, wie stark der Formaldehydgehalt gegerbter Caseinproben von der Dauer des Auswaschens abhängt, ein Umstand, der beim präparativen Arbeiten unbedingt beachtet werden muss.

Die Analyse auf Formaldehydgehalt der fertigen, lufttrockenen Präparate wurde nach der von uns ausgearbeiteten Methode[1]) der Destillation mit verdünnter Phosphorsäure durchgeführt. Zuvor wurde der Trockengehalt der Proben bestimmt, und zwar durch Trocknen im Hochvakuum (0,04—0,06 mm Hg) bei Zimmertemperatur neben Phosphorpentoxyd bis zur Gewichtskonstanz, die jeweils nach 2 Tagen erreicht war[2]). Die Analysen wurden stets doppelt ausgeführt.

[1]) l. c.

[2]) Bevor man mit den Proben ins Hochvakuum geht, müssen sie einige Stunden im Wasserstrahlvakuum (14—20 mm) neben konz. Schwefelsäure vorgetrocknet werden. Sonst bläst das im Hochvakuum zuerst sehr rasch verdampfende Wasser einen Teil des Caseinpulvers aus dem Wägeglas heraus.

Tabelle 1 gibt an, wieviel Formaldehyd vom Casein (eigenes Präparat) aus 0,2-, 0,5-, 2-, 10- und 38-proz. Formaldehydlösung in verschiedenen Zeiten gebunden wurde. Die Zimmertemperatur betrug während der ganzen Versuchsreihe $17^0 \pm 2^0$.

Tabelle 1.

Die Formaldehydbindung des Caseins bei der Härtung mit Formaldehydlösungen verschiedener Konzentration.

Zeichen des Präparates	Konzentration der Gerblösung in %	Gerbzeit in Tagen	% CH_2O ber. auf Trockencasein
0,2 I	0,2	1	0,19
0,2 II	0,2	9	0,69
0,2 III	0,2	28	1,05
0,5 I	0,5	1	0,42
0,5 II	0,5	9	1,34
0,5 III	0,5	28	1,67
2 I	2	1	1,14
2 II	2	9	1,80
2 III	2	28	1,95
10 I	10	1	1,80
10 II	10	9	1,99
10 III	10	28	2,33
38 I	38	1	1,91
38 II	38	9	2,37
38 III	38	28	3,15

Die dazu gehörende Fig. 1 gibt die Verhältnisse graphisch wieder. Bemerkenswert ist die anfangs sehr rasche Zunahme des gebundenen Formaldehyds. Die Kurven nähern sich aber nicht asymptotisch

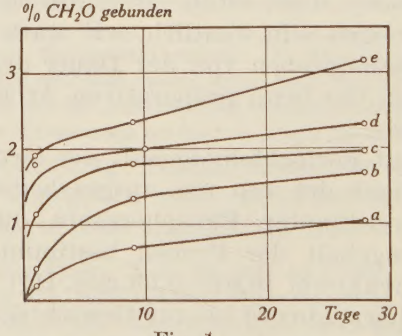


Fig. 1.

Zeitlicher Verlauf der Nassgerbung bei verschiedenen Konzentrationen der Formaldehydlösung (a = 0,2, b = 0,5, c = 2, d = 10, e = 38%).

einem Grenzwert, vielmehr scheint die Reaktion ungefähr von zehn Tagen an ziemlich gleichförmig fortzuschreiten und ist auch nach 4 Wochen noch keineswegs beendet. Nach den Kurvenbildern müssen

sich hier — besonders klar bei den höher konzentrierten Lösungen — zwei ganz verschiedene Reaktionen überlagern, nämlich eine rasch verlaufende, die nach 10 Tagen praktisch beendet ist, und eine sehr viel langsamer verlaufende, bei der die Grösse des Umsatzes innerhalb der betrachteten Zeitspanne proportional der Zeit ist. Das Kurvenbild soll später eingehender diskutiert werden, wenn wir uns mit der Bindungsart des Formaldehyds befassen.

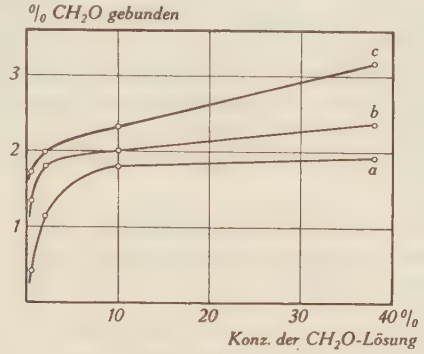


Fig. 2.

Die Formaldehydbindung des Caseins nach 1 (a), 9 (b) und nach 28 (c) Tagen in Abhängigkeit von der einwirkenden Formaldehydkonzentration.

Trägt man den gebundenen Formaldehyd in Abhängigkeit von der Konzentration der Gerblösung für die drei verschiedenen Zeitdauern auf, so zeigt sich, dass die Reaktion bei Steigerung der Konzentration von 0,2 auf 10 % sehr stark beschleunigt wird (Fig. 2). Geht man mit der Konzentration noch höher hinauf (38 %), so wird dadurch nicht sehr viel erreicht, was bei der technischen Durchführung der Formaldehydgerbung zu beachten ist. *J. H. Highberger* und *F. O'Flaherty*[1]) fanden ähnliche Verhältnisse bei der Formaldehydgerbung von Kollagen. Sie erklären die verhältnismässig geringe Wirksamkeit konzentrierter Formaldehydlösung damit, dass in ihr ein beträchtlicher Teil des Formaldehyds nicht monomer, sondern polymerisiert in Form von Polyoxymethylenhydraten vorliegt. Die letzteren sollen mit dem Protein nicht reagieren. Wir werden später an Hand eigener Versuche zeigen, dass es in der Tat sehr unwahrscheinlich ist, dass Casein Polyoxymethylenhydrate bindet.

II. Die Gerbung mit gasförmigem Formaldehyd.

Im Gegensatz zu allen anderen gebräuchlichen Gerbmitteln kann der Formaldehyd nicht nur in wässriger Lösung, sondern auch als Gas zur Anwendung gebracht werden. Dieser Umstand bietet interessante Möglichkeiten. Beim Arbeiten mit wässrigen Lösungen befindet sich das zu gerbende Proteingel während der Gerbung natür-

[1]) J. Int. Soc. Leather Trades Chem. **23**, 549 (1939).

lich notwendigerweise immer in einem mehr oder weniger stark gequollenen Zustand. In der Gerberei wird dem Quellungszustand der Blössen bekanntlich viel Aufmerksamkeit geschenkt, denn man weiss, dass er für den Verlauf und das Resultat der Gerbung von grosser Bedeutung ist. Mit Formaldehyd hat man die extreme Möglichkeit, die Gerbung mit einem ungequollenen, ja beliebig trockenen Proteingel durchzuführen. Man braucht ja nichts anderes zu tun, als das lufttrockene Eiweiss in eine formaldehydhaltige Atmosphäre zu bringen. Der Formaldehyd diffundiert dann allmählich in das Protein hinein und bewirkt dort die Gerbung. Es scheint möglich, dass auf solche Weise durch die Gerbung eine besonders dichte Struktur fixiert wird, was dazu führen müsste, dass mit der Gasgerbung ein Protein von geringerer Quellfähigkeit erhalten werden kann als mit der Nassgerbung.

Zur Abklärung dieser Frage, die nicht nur theoretisch, sondern auch praktisch interessant ist, wurde eine Reihe solcher gasgegerbter Präparate hergestellt.

Herstellung der gasgegerbten Caseine.

Auf Papier in dünner Schicht ausgebreitete Caseinproben wurden in kleinen Exsikkatoren über Schalen mit genügend konzentrierter Formaldehydlösung aufbewahrt. Wir benutzten

1) käuflichen 38-proz. Formaldehyd. Dieser besitzt noch einen beträchtlichen Wasserdampfdruck, der jedenfalls über demjenigen liegt, der normalerweise in der Zimmerluft herrscht. Wir bezeichnen diese Art der Gerbung als „feuchte Gasgerbung";
2) eine Mischung, hergestellt durch Auflösen von 26 g wasserfreiem Calciumchlorid in 100 cm^3 38-proz. Formaldehyd. Der Calciumchloridzusatz hatte den Zweck, den Wasserdampfdruck der Lösung herabzusetzen („trockene Gasgerbung").

Nach bestimmter Zeit wurden die Proben herausgenommen und 6 Tage immer noch ausgebreitet an der Luft liegen gelassen, damit der bloss absorbierte Formaldehyd abgegeben werden konnte. Nach dieser Zeit war der zuerst sehr starke Formaldehydgeruch vollständig verschwunden. Diese Behandlung ist allerdings eine willkürliche, denn die Verhältnisse sind ähnlich wie beim Auswaschen der nassgegerbten Proben. Bei noch längerem Liegen an der Luft oder auch beim Auswaschen verlieren diese gasgegerbten Proben weiter Formaldehyd, der wohl nicht mehr nur absorbiert war.

Wir machten später folgenden Versuch mit einem Präparat, das 50 Tage trockene Gasgerbung erlitten hatte. Nach 6tägigem Liegen an der Luft hatte die völlig geruchlose Probe einen Formaldehydgehalt von 3,22%. Nach 3 weiteren Wochen an der Luft war dieser auf 2,31% gesunken. Jetzt wurde noch erschöpfend mit Wasser ausgewaschen. Die Analyse ergab nur noch 1,81%.

Dass auch beim Liegen an der Luft, gleich wie beim Auswaschen, so lange Formaldehyd abgegeben wird, braucht nicht zu verwundern, wenn man bedenkt, dass gegerbtes, lufttrockenes Casein bei einer relativen Feuchtigkeit der Atmosphäre von 60—70% immer noch 12% Wasser enthält.

Dieses Wasser, das auch im scheinbar trockenen Proteingel enthalten ist, ermöglicht nicht nur die Abspaltung grosser locker gebundener Formaldehydanteile, sondern erleichtert auch das Abdiffundieren des Aldehyds aus dem Inneren der Gelteilchen, sei er nun gebunden oder bloss absorbiert gewesen.

Umgekehrt wird Formaldehyd aus der Gasphase um so schneller aufgenommen, je mehr Feuchtigkeit das Casein enthält. Dies zeigt sich sehr deutlich, wenn man den zeitlichen Verlauf der Gerbung über gewöhnlicher und mit Calciumchlorid versetzter Formaldehydlösung vergleicht (Tab. 2, Fig. 3). Völlig trockenes Casein, das in einem Exsikkator neben konz. Schwefelsäure und Paraformaldehyd aufbewahrt wird, wird innerhalb der beobachteten Zeiten nur oberflächlich angegerbt.

Tabelle 2.

Zeitlicher Verlauf der Gasgerbung.

Zeichen des Präparates	Gerbzeit in Stunden	% CH_2O im gehärteten Casein	
		I	II
		38-proz. Formaldehyd	38-proz. Formaldehyd + $CaCl_2$
G 5 M	5	1,82	0,98
G 20 M	20	2,77	2,00
G 30 M	30	2,88	2,29

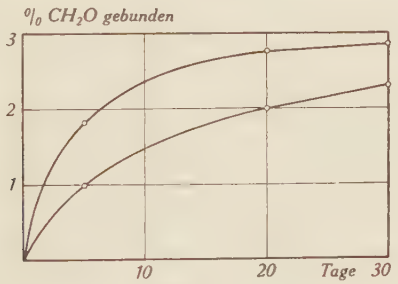


Fig. 3.

Zeitlicher Verlauf der Gasgerbung
(obere Kurve mit 38-proz. Formaldehyd, untere Kurve dito mit $CaCl_2$).

Die Zeitkurven für die Gasgerbung haben im übrigen erwartungsgemäss eine ähnliche Form wie die für die Nassgerbung. Wie nicht anders möglich, verläuft die Gerbung in den Dämpfen des Formaldehyds weniger rasch als in der Lösung selbst.

Die in Fig. 3 wiedergegebenen Kurven beziehen sich auf das staubfeine Casein von *Merck*. Die Gasgerbung des grobkörnigen eigenen Präparates verlief etwas langsamer, sonst aber analog.

Zusammenfassung.

Für nachfolgende Untersuchungen wurde eine Reihe formaldehydgehärteter Caseinpräparate hergestellt. Die Härtung geschah einerseits durch Einlegen in Formaldehydlösungen verschiedener Konzentration, andererseits durch Einwirkenlassen von Formaldehyddämpfen auf trockenes Casein („Gasgerbung"). In beiden Fällen wurde der zeitliche Verlauf der Formaldehydbindung über 30 Tage verfolgt. Dieselbe hat sich am Schlusse dieser Zeit stark verlangsamt, ein Endwert für die gebundene Formaldehydmenge ist jedoch noch nicht erreicht. Es wurde gefunden, dass der Formaldehydgehalt der Präparate zudem stark davon abhängt, wie lange dieselben nach der Härtung ausgewaschen werden (Versuche bis 24 Tage), resp. wie lange man sie — nach der Gasgerbung — an der Luft liegen lässt.

Bern, chemisches Institut der Universität,
Organische Abteilung.

Sonderabdruck aus
HELVETICA CHIMICA ACTA
Volumen XXVI Fasciculus Quartus.

109. Die Umsetzung des Caseins mit Formaldehyd. IV. Der Einfluss der Formaldehydgerbung auf das Quellungsvermögen des Caseins[1])

von **Hs. Nitschmann** und **H. Hadorn.**

(4. V. 43.)

Über die Quellung im allgemeinen und die der Proteine im besonderen ist ausserordentlich viel gearbeitet worden[2]). Trotzdem ist es heute noch nicht möglich, alle Erscheinungen theoretisch einheitlich und widerspruchsfrei zu deuten. Auch die Quellung des Caseins ist wiederholt Gegenstand der Untersuchung gewesen. So haben *J. R. Katz*[2]), ferner *R. Fricke* und *J. Lücke*[3]) Dampfdruckisothermen des Caseins aufgenommen. Jedoch ist uns nicht bekannt, dass ähnliche Messungen schon an mit Formaldehyd gehärtetem Casein ausgeführt worden sind.

Praktisch besonders wichtig ist natürlich die maximale Quellung, wie sie sich in gesättigtem Wasserdampf oder schneller noch beim Einlegen in Wasser einstellt. Aber gerade die exakte Bestimmung dieser Werte stösst, wie gleich noch gezeigt wird, auf erhebliche Schwierigkeiten. Dampfdruckisothermen dagegen können verhältnismässig leicht aufgenommen werden. Wir stellten uns die Aufgabe,

[1]) III. Mitteilung: Helv. **26**, 1075 (1943).

[2]) Zusammenfassende Darstellungen: *J. R. Katz*, „Die Quellung", Ergebn. exakt. Naturw. **3**, 372 (1924); *W. Pauli* und *Valkó*, Kolloidchemie der Eiweisskörper, S. 207 (1933).

[3]) Z. El. Ch. **36**, 308 (1930).

diejenigen von ungegerbtem und gegerbtem Casein miteinander zu vergleichen.

I. Die Dampfdruckisotherme des Caseins und ihre Verschiebung durch die Formaldehydgerbung.

Die Dampfdruckisotherme gibt die Beziehung zwischen dem Wasserdampfdruck (wenn es sich wie hier um Wasser als Quellungsmittel handelt) und dem Wassergehalt der Lösung oder des Gels für eine bestimmte Temperatur wieder. Es ist üblich und zweckmässig, statt des absoluten Dampfdruckes die relative Feuchtigkeit der mit dem Gel im Gleichgewicht befindlichen Atmosphäre anzugeben, weil diese im Gegensatz zu ersterem nur wenig temperaturabhängig ist. Zur Aufnahme der Dampfdruckisothermen benutzten wir eine der ältesten und einfachsten Methoden, die es gibt.

Kleine Mengen Casein, welche bei Zimmertemperatur im Hochvakuum neben Phosphorpentoxyd bis zur Gewichtskonstanz getrocknet worden waren, wurden in kleinen Exsikkatoren über Schwefelsäure-Wassermischungen von bekanntem Dampfdruck aufbewahrt, bis sich Gleichgewicht eingestellt hatte. Die Gewichtszunahme des Caseins entspricht dem aufgenommenen Quellungs-wasser. Die absolute Genauigkeit der Werte kann also nicht grösser sein als die der Dampfdruckwerte der Schwefelsäurelösungen, die man zu Grunde legt. Wir arbeiteten mit 8 verschieden konzentrierten Schwefelsäuren, deren Wasserdampfdrucke wir dem Tabellenwerk von *Landolt-Börnstein* (5. Aufl., Bd. II, 1395—6) entnahmen. Aus dem Dampfdruck der betreffenden Schwefelsäure und aus dem Dampfdruck des reinen Wassers bei derselben Temperatur ergibt sich die relative Feuchtigkeit der Gleichgewichtsatmosphäre. Innerhalb von 3° darf der relative Dampfdruck als temperaturunabhängig angesehen werden. Höchste Temperaturkonstanz war deshalb für unsere Zwecke nicht erforderlich. Wichtig ist aber, dass die Exsikkatoren allseitig ganz gleiche Temperatur aufweisen und nicht einseitig Wärme abgeben oder aufnehmen. Rasche Temperaturschwankungen sind unbedingt zu vermeiden, da sonst Gefahr besteht, dass Schwefelsäure und Casein im Inneren des Exsikkators vor der Wägung nicht ganz gleiche Temperatur hatten. Die nachfolgenden Messungen wurden während einiger Sommerwochen in einem Kellerraum gemacht, wo die Temperatur nur sehr langsam zwischen 17 und 19° schwankte. Die Einwagen an Casein betrugen 0,1 bis 0,15 g, die Menge der beigefügten Schwefelsäure ca. 50 cm^3, so dass ihre Konzentration durch den Wasseraustausch mit dem Casein nicht merklich verändert werden konnte. Durch vorsichtiges Schwenken der Exsikkatoren wurde von Zeit zu Zeit für richtige Durchmischung der Schwefelsäure gesorgt. Zur schnelleren Gleichgewichtseinstellung wurden die Exsikkatoren nach der Beschickung rasch evakuiert. Beim Wiederöffnen wurde die Luft, die man einströmen liess, langsam durch eine Waschflasche strömen gelassen, welche Schwefelsäure der gleichen Konzentration wie die im Exsikkator enthielt. Diese Vorsichtsmassregel ist besonders bei den wasserarmen Präparaten unerlässlich, da dieselben aus der Luft sehr rasch Feuchtigkeit aufnehmen. Die Wägeglaschen mit dem Casein wurden nach dem Öffnen des Exsikkators sofort geschlossen und gewogen. Derart wurde alle 24 Stunden gewogen, bis Gewichtskonstanz erreicht war. Dies war meist schon am dritten Tag der Fall.

Das Wasserbindungsvermögen des Caseins zeigt wie das der meisten anderen Gele Hysteresis, d. h. der Wassergehalt bei einer bestimmten relativen Luftfeuchtigkeit ist verschieden, je nachdem ob man ein trockenes Gel Wasser aufnehmen, oder ein feuchteres Wasser abgeben lässt (vgl. Tab. 1). Der — scheinbare — Gleich-

gewichtszustand, der sich einstellt, ist also von der Vorgeschichte des Gels abhängig. Die Werte für den Wassergehalt werden bei Bewässerung stets tiefer gefunden als bei Entwässerung. Wie üblich haben wir beide Werte bestimmt und daraus das Mittel genommen.

Tabelle 1.

Wassergehalt von gegerbtem und ungegerbtem Casein bei verschiedener relativer Luftfeuchtigkeit (g Wasser pro 100 g trockenes Casein).

Konz. der H_2SO_4 in %	% relative Luftfeuchtigk.		0,2 I 0,19% F.	38 III 3,19% F.	G 7 f 2,93% F.	Casein H	Fehlerbreite
84,48	0,9	Bewässerung	0,7	0,7	0,8	0,9	± 0,1
73,13	4,9	Bewässerung	2,0	2,0	2,0	2,2	± 0,15
		Entwässerung	2,5	2,4	2,4	2,9	
		Mittel	2,3	2,2	2,2	2,6	
64,47	12,8	Bewässerung	4,0	4,0	4,2	4,4	± 0,2
		Entwässerung	5,3	5,1	5,0	5,7	
		Mittel	4,7	4,6	4,6	5,1	
52,13	33,0	Bewässerung	8,1	7,8	7,8	8,1	± 0,2
		Entwässerung	9,4	8,8	8,8	9,4	
		Mittel	8,8	8,3	8,3	8,8	
37,69	61,9	Bewässerung	12,3	12,1	11,8	12,4	± 0,2
		Entwässerung	15,2	14,7	14,6	15,4	
		Mittel	13,8	13,4	13,2	13,9	
24,26	82,7	Bewässerung	18,6	18,1	16,8	17,8	± 0.2
		Entwässerung	20,2	19,9	19,4	20,5	
		Mittel	19,4	19,0	18,6	19,7	
9,82	94,4	Bewässerung	27,4	25,9	23,6	28,5	± 0,8
		Entwässerung	29,2	27,4	24,2	29,4	
		Mittel	28,6	26,7	23,9	29,0	
5,0	97,5	Bewässerung	31,2	29,4	26,6	33,0	± 2,5

Wir begannen mit völlig trockenem Casein, welches mit der Schwefelsäurereihe mit steigendem Wassergehalt bewässert wurde. Alsdann wurde die gleiche Reihe umgekehrt durchlaufen bis zur erneuten Trocknung im Hochvakuum. Zur Kontrolle wurde dann die Bewässerung nochmals ausgeführt; dabei wurden genau dieselben Werte gefunden wie das erste Mal. Die Hysteresis ist also an ein und demselben Präparat genau reproduzierbar. Wir untersuchen folgende 4 Präparate[1]):

1. Präparat: Ungegerbtes Casein, eigenes Präparat, Ausgangsprodukt für die nachfolgenden gegerbten Proben.

[1]) Näheres über die Herstellung der in dieser Untersuchung verwendeten Präparate findet sich in der III. Mitteilung, Helv. **26**, 1075 (1943).

2. Präparat: 0,2 I: 1 Tag Nassgerbung mit 0,2-proz. Formaldehydlösung, „normal" ausgewaschen, Formaldehydgehalt 0,19%.

3. Präparat: 38 III: 28 Tage Nassgerbung mit 38-proz. Formaldehyd, „erschöpfend" ausgewaschen, Formaldehydgehalt 3,19%.

4. Präparat: G 7 f: 7 Tage „feuchte" Gasgerbung, 6 Tage an der Luft gelegen, nicht ausgewaschen, Formaldehydgehalt 2,93%.

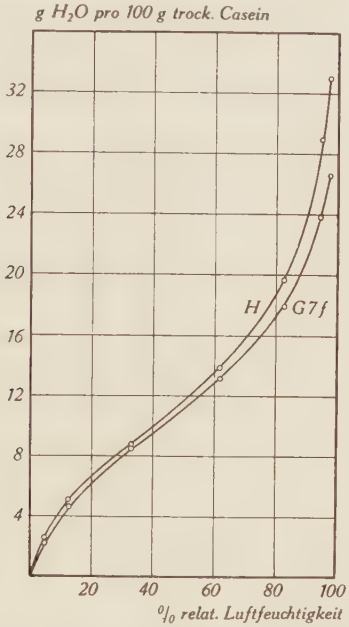


Fig. 1.
Wasserdampfdruckisothermen von ungegerbtem (H) und von gasgegerbtem (G 7 f) Casein.

Die Feuchtigkeitsgehalte dieser Präparate bei 8 verschiedenen relativen Wasserdampfdrucken finden sich in Tabelle 1. Die angegebenen Werte bedeuten g Wasser, die von 100 g trockenem Casein gebunden werden. Fig. 1 zeigt zunächst die mit den Mittelwerten erhaltene Dampfdruckisotherme des ungegerbten Caseins. Sie fällt von 60% relativer Luftfeuchtigkeit an aufwärts sehr genau mit derjenigen von *J. R. Katz*[1]) zusammen. Unterhalb dieser Werte liegen unsere Wassergehalte etwas tiefer[2]). Die zweite der eingezeichneten Kurven ist diejenige des gasgegerbten Präparates. Wir werden die Dampfdruckisothermen im Anschluss an die Quellungsversuche in flüssigem Wasser eingehender diskutieren. Es sei vorläufig auf folgende Punkte aufmerksam gemacht:

1. Die Dampfdruckisotherme von gegerbtem Casein zeigt eine vollständig analoge S-Form wie die von ungegerbtem. Kräftig gegerbtes Casein (38 III, G 7 f) bindet bei

[1]) l. c., Werte auch im Buch von *Pauli-Valkó*.

[2]) Vgl. die logarithmische Darstellung der Isothermen in Fig. 4, in welcher die Werte von *Katz* miteingezeichnet sind.

allen Feuchtigkeitsgraden der Atmosphäre weniger Wasser als ungegerbtes. Die Unterschiede sind aber merkwürdig gering; sie sind um so grösser, je höher die relative Feuchtigkeit ist.

2. Die Unterschiede zwischen den 3 untersuchten gegerbten Caseinen können somit auch nicht gross sein und man muss schon relative Feuchtigkeiten von über 60% ins Auge fassen, um deutliche Differenzen zu bemerken. Das nassgegerbte Präparat mit 0,19% Formaldehyd scheint ungefähr in der Mitte zwischen dem ungegerbten Casein und dem nassgegerbten mit 3,19% zu liegen, trotzdem das letztere 17mal mehr Gerbstoff enthält als das erstere. Besonders interessant ist der Vergleich der Zahlen für das nassgegerbte Präparat 38 III und das gasgegerbte G 7 f. Der Formaldehydgehalt der beiden ist fast gleich; der des gasgegerbten etwas niedriger. Von 80% relativer Luftfeuchtigkeit an zeigt sich unzweideutig, dass das gasgegerbte Produkt weniger Wasser aufnimmt als das nassgegerbte. Das Wasserbindungsvermögen hängt also von der Art, wie die Gerbung durchgeführt wurde, ab, auch wenn die gebundene Gerbstoffmenge gleich ist.

Die Tatsache, dass die Differenzen mit zunehmender Luftfeuchtigkeit immer deutlicher werden, fordert dazu auf, die vorliegenden Daten durch Messungen bei 100% relativer Luftfeuchtigkeit zu ergänzen. Es bietet jedoch grosse Schwierigkeiten, das maximale Quellungsvermögen zu ermitteln, indem man das Gel einfach neben reinem Wasser ins Gleichgewicht kommen lässt. Bei sehr hohen relativen Feuchtigkeiten will sich bei den Präparaten keine Gleichgewichtskonstanz einstellen, denn kleinste Temperaturunterschiede innerhalb des Exsikkators bewirken schon, dass der Wasserdampf über dem Präparat ein wenig über- oder untersättigt ist. Da die Dampfdruckisotherme in diesem Gebiet sehr steil verläuft, wirkt sich dies auf den Wassergehalt der Präparate sehr stark aus[1]).

Wir versuchten deshalb, auf anderem Wege zu einer Bestimmung des maximalen Quellungsvermögens zu gelangen. Wenn es, wie bei uns, nicht auf eine absolute Grössenbestimmung, sondern nur auf vergleichende Messungen ankommt, kann bei pulvrigen oder körnigen Substanzen das Sedimentationsvolumen der gequollenen Substanz gute Dienste leisten.

II. Vergleichende Messungen der maximalen Quellung.

1. Das Sedimentationsvolumen.

Die Bestimmung ist ausserordentlich einfach und wurde folgendermassen ausgeführt:

Von jedem Präparat wurden 0,5 g auf 1 mg genau abgewogen und in graduierte Reagenzgläser von 11,3 mm innerem Durchmesser eingefüllt. Das Casein wurde zunächst mit ca. 5 cm^3 Wasser übergossen und mit einem Glasstab gründlich durchmischt. Der Glasstab wurde zuletzt abgespritzt. Jetzt wurden die Gläser mit Gummistopfen verschlossen und während einer Stunde häufig umgeschüttelt[2]). Nun wurden die Gläser

[1]) Vgl. z. B. *P. v. Schröder* (Z. physikal. Ch. **45**, 76 (1903)), der beim Quellen von Gelatine in Wasser und in gesättigtem Wasserdampf stark differierende Werte erhielt und diesen Effekt als „scheinbaren" Widerspruch zum 2. Hauptsatz diskutiert.

[2]) Die für die maximale Quellung erforderliche Zeit hängt vom Dispersitätsgrad des Caseins ab.

bis zur 10 cm³-Marke mit Wasser aufgefüllt, nochmals durchmischt und dann verschlossen in vertikaler Stellung im Kühlschrank bei 0° stehen gelassen. Von Zeit zu Zeit wurde das Sedimentationsvolumen abgelesen. Nach 3 Tagen hatte dasselbe jeweils seinen konstanten Endwert erreicht.

Natürlich hängen die Sedimentationsvolumina nicht nur von der Quellung, sondern auch vom Verteilungszustand des Stoffes ab. Wir können also nur solche Präparate miteinander vergleichen, die durch Gerbung aus dem gleichen Casein hergestellt worden sind. In der Tat gaben das Casein von *Merck* und unser eigenes Präparat ganz verschiedene Werte. Tabelle 2 enthält die Quellungsvolumina von 4 verschieden stark gegerbten Caseinen sowie vom Ausgangsprodukt. Es handelt sich um das staubfeine Präparat von *Merck*. Die fertigen Proben waren durch ein Mehlsieb Nr. 10 gesiebt worden, welches sie fast ohne Rückstand passierten. Zur Gerbung dieser Präparate war 5-proz. Formaldehydlösung verwendet worden. Temperatur bei der Gerbung 17°; „normal" ausgewaschen.

Tabelle 2.

Sedimentationsvolumina nassgegerbter Caseine, gequollen in Wasser.

Zeichen des Präparates	Gerbzeit in St.	% CH_2O im Präp.	Sed.-vol. nach 3 Tagen in cm³
Casein M	ungegerbt	0	3,9
K 1 M	1	0,23	2,65
K 2 M	17	1,56	2,25
K 3 M	48	1,88	2,3
K 4 M	188	2,37	2,3

Tabelle 3 enthält die Quellungsvolumina einiger gasgegerbter Präparate. Ausgangsmaterial gleich wie bei Tabelle 2.

Tabelle 3.

Sedimentationsvolumina gasgegerbter Caseine, gequollen in Wasser.
f bedeutet „feuchte" Gasgerbung, die Zahl nach G bedeutet die Gerbzeit in Tagen (bei 5°).

Zeichen des Präparates	% CH_2O im Präp.	Sed.-vol. nach 3 Tagen in cm³
Casein M	ungegerbt	3,9
G 5 M	0,98	2,75
G 5 f M	1,82	2,2
G 20 M	2,00	2,3
G 20 f M	2,29	2,2
G 30 f M	2,88	2,2

Figur 2 zeigt die Abhängigkeit des Quellungsvolumens vom Formaldehydgehalt bei nassgegerbtem und bei gasgegerbtem Casein (Kurven Ia und Ib). Bei der Betrachtung der Kurven fällt folgendes auf:

1. Bei der Nassgerbung genügt schon ein sehr kleiner Formaldehydgehalt, um die Quellung des Caseins sehr stark herabzudrücken. Das Minimum des Quellungsvermögens ist bereits mit ca. 1% Formaldehyd erreicht, höhere Formaldehydgehalte vermögen die Quellung nicht noch mehr herunterzusetzen.

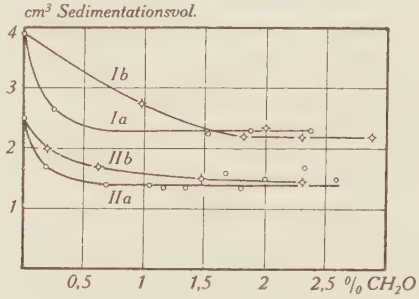


Fig. 2.

Sedimentationsvolumina nassgegerbter (a) und gasgegerbter (b) Caseine, gequollen in Wasser. I. Körnung feinpulvrig, II. Körnung griessförmig.

2. Die Kurve der gasgegerbten Präparate verläuft ähnlich, nur anfangs viel flacher, d. h. gasgegerbte Caseine mit Formaldehydgehalten unter 1,5% zeigen eine stärkere Quellung als nassgegerbte mit gleicher analytischer Zusammensetzung. Die Erklärung ist wohl darin zu suchen, dass die ersteren nicht gleichmässig durchgegerbt sind. Bei den in die Formaldehydlösung eingebrachten Caseinteilchen bewirkt die rasch einsetzende Quellung, dass der Gerbstoff mit dem Wasser bis ins Innere dringt. Auch das Nachdiffundieren von Formaldehyd geht dank der Quellung ziemlich rasch. Man darf deshalb annehmen, dass die Nassgerbung in nicht allzu verdünnten Formaldehydlösungen über den ganzen Querschnitt der Teilchen ziemlich gleichmässig verläuft. Anders bei der Gasgerbung: Eine Quellung findet nicht statt. Der Formaldehyd kann deshalb nur langsam durch das sehr dichte Gel hindurchdiffundieren. Die reaktionsfähigen Gruppen in den Randschichten der Caseinteilchen haben deshalb Zeit, den Formaldehyd abzufangen. So bekommt man zuerst ein Produkt, dessen Körner an der Oberfläche kräftig angegerbt sind, im Inneren aber noch so gut wie keinen Formaldehyd aufgenommen haben. Beim Einweichen eines solchen Präparates in Wasser bringt der hohe Quellungsdruck des ungegerbten Kernes die Schale der Körner zum Platzen. Das verhältnismässig grosse Sedimentationsvolumen wird dadurch ohne weiteres verständlich[1]).

3. Bei Präparaten mit 1,5 bis 3% Formaldehyd scheinen die gasgegerbten weniger zu quellen als die nassgegerbten, was in Übereinstimmung mit den Dampfdruckisothermen stehen würde. Jedoch sind die Differenzen zu wenig ausgeprägt, resp. ist die Fehlerbreite zu gross, als dass man sichere Schlüsse ziehen dürfte.

Auch eine weitere Messreihe mit Gerbproben unseres eigenen, grobkörnigen Caseins gestattete nicht, eindeutige Unterschiede im Quellungsvermögen der nass- und gasgegerbten Präparate festzustellen. Nur bei Formaldehydgehalten unter 1% quollen auch hier wieder die gasgegerbten Proben aus den oben erwähnten Gründen

[1]) Das schichtenweise Vordringen der Gasgerbung sieht man besonders schön an Natriumcaseinatfasern, wie sie im Trockenspinnverfahren aus 25-proz. Lösungen erhalten werden können. Die Anfangsstadien der Gerbung sind dadurch charakterisiert, dass die Fasern beim Einbringen in Wasser aufplatzen. Das Innere ist noch wasserlöslich, während eine mehr oder weniger dicke Haut ihre Wasserlöslichkeit bereits verloren hat.

stärker. Die Sedimentationsvolumina dieser Reihe sind ebenfalls in Figur 2 eingezeichnet (Kurven IIa, IIb). Auf die Wiedergabe der Zahlenwerte verzichten wir angesichts der beträchtlichen Streuung, welche besonders die Werte der stärker nassgegerbten Präparate zeigen[1]). Bemerkt sei nur noch, dass prozentual die Verminderung des Quellungsvolumens durch die Gerbung beim pulverförmigen und beim körnigen Casein gleich ist. In beiden Fällen beträgt das Quellungsvolumen der kräftig gegerbten Proben ca. 56 % desjenigen des rohen Caseins.

2. Gravimetrische Bestimmung der maximalen Quellung.

Da die Bestimmung des Sedimentationsvolumens kleine Unterschiede im Quellungsvermögen nicht mit der gewünschten Deutlichkeit hervortreten liess, waren wir bemüht, doch noch mit einer gravimetrischen Methode die maximale Quellung zu bestimmen. Wie schon angedeutet, besteht die Schwierigkeit nur darin, die Substanz im maximal gequollenen Zustand, aber auch nicht mit mehr als gerade nur dem Quellungswasser beladen, zur Wägung fertig zu machen. Kompakte, homogene Gelstücke kann man nach dem Quellen in Wasser mit Filtrierpapier rasch abtrocknen und wägen. Bei gequollenen Pulvern oder Fasern ist es unmöglich, auf diese Weise reproduzierbare Gewichte zu bekommen. Es gelingt aber, wenn man das anhaftende Wasser durch Zentrifugieren entfernt. Voraussetzung ist, dass man stets genau dieselben Arbeitsbedingungen einhält. Auch diese Methode ergibt wahrscheinlich nicht die absolut richtigen Werte für die maximale Quellung, da die beiden Hauptfehlerquellen — Zurückhaltung von kapillar gebundenem Wasser einerseits und Ausquetschen von Quellungswasser durch den Zentrifugaldruck anderseits — das Resultat in unbekannter Weise beeinflussen. Unsere Methode ist aber gut geeignet, um Präparate gleicher Teilchengrösse miteinander zu vergleichen.

Arbeitsvorschrift.

Man wägt 0,4—0.5 g der lufttrockenen Caseinprobe, deren Feuchtigkeitsgehalt vorher bestimmt wurde, in ein kleines Becherglas ab und verrührt sie gut mit 20—30 cm^3 Wasser. Zur Quellung wird etwa eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen[2]).

Unterdessen wird ein Goochtiegel mit gelochtem Siebboden gut mit Wasser benetzt, ein kleines, passendes Papierfilter auf den Boden des Tiegels gebracht und etwas Wasser aufgegossen. Die Figur 3 zeigt, wie mit Hilfe eines durchbohrten Korkstopfens und eines Gummiringes der Tiegel bequem in ein Zentrifugenglas eingesetzt werden kann. Das Glas wird oben verschlossen, damit die Luft über der Flüssigkeit mit Wasserdampf gesättigt bleibt. Nun wird eine genau gemessene Zeit lang zentrifugiert (bei uns 10 Min. bei 3000 Touren pro Minute; Abstand Achse—Tiegelboden 11 cm) und der Tiegel feucht

[1]) Sie dürfte wahrscheinlich zur Hauptsache auf ungleiches Auftrocknen der Proben bei der Herstellung zurückzuführen sein.

[2]) Bei unsern Präparaten war nach dieser Zeit die maximale Quellung stets erreicht. Bei grobkörnigerem Material müsste eventuell länger gewartet werden.

in einem verschlossenen Wägeglas gewogen. Bei Wiederholung dieser Operation gelingt es, das Gewicht des feuchten Tiegels auf ± 1 mg genau zu reproduzieren. Völlig ungeeignet sind Filtertiegel mit porösem Boden, z. B. Glassintertiegel. Es gelingt hier nie, annähernde Gewichtskonstanz des feuchten Tiegels zu erreichen, da offenbar die in der porösen Masse zurückgehaltene Wassermenge stark variiert.

Fig. 3.

Die gequollene Caseinprobe wird nun in den derart vorbehandelten und gewogenen Tiegel filtriert unter Verwendung eines geringen Unterdrucks, der das Papierfilter festdrückt. Es ist darauf zu achten, dass das Casein stets mit Wasser bedeckt bleibt. Die gut benetzte Probe (2—3 mm überstehendes Wasser) wird ins Zentrifugenglas gebracht, wiederum genau gleich lang bei gleicher Umdrehungszahl zentrifugiert und sofort gewogen. Aus der Gewichtszunahme und dem Trockengehalt der abgewogenen Caseinmenge lässt sich das Quellungswasser berechnen.

Höchste Genauigkeit ist auch von dieser Methode nicht zu erwarten. Bei Wiederholung der Bestimmung am gleichen Präparat beobachtet man gelegentlich Streuungen von bis zu ± 5% des Quellungswassers. Die Mittelwerte aus mehreren Bestimmungen sind jedoch recht gut reproduzierbar.

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse, welche wir mit unserer Methode erhalten haben, für einige typische Präparate zusammengestellt. Es sind dieselben Präparate, für die früher die Dampfdruckisothermen

Tabelle 4.

Maximale Quellung von gegerbtem und ungegerbtem Casein in Wasser, gravimetrisch bestimmt.

Zeichen des Präparates	Bemerkungen	% CH_2O im Präp.	g Quellungswasser pro 100 g trockenes Casein gewogen	Mittel
Casein	ungegerbt, griessförmig	0	128,9 138,9 133,1	133,5
0,2 I	nass gegerbt mit 0,2-proz. Lösung	0,19	97,5 99,5 98,4	98,5
G 1	gasgegerbt	0,20	132,6 119,8 125,3	125,9
38 III	nass gegerbt mit 38-proz. Lösung	3,19	88,7 92,3	90,5
G 7 f	gasgegerbt	2,93	78,6 78,1 86,3	80,8

(siehe Tab. 1) aufgenommen worden waren. Nur G 1, eine mit Formaldehydgas schwach angegerbte Probe (1 Tag trockene Gasgerbung) ist neu dazu genommen worden. Alle Präparate wurden aus dem gleichen Casein hergestellt.

Ein Vergleich der Mittelwerte in der letzten Kolonne zeigt folgendes:

1. Es bestätigt sich erneut, dass gasgegerbte Präparate mit sehr kleinen Formaldehydgehalten (0,2%) ein viel höheres Quellungsvermögen besitzen als nassgegerbte mit gleich viel Formaldehyd.

2. Es bestätigt sich, dass bei der Nassgerbung die ersten Zehntelprozente Formaldehyd die Quellfähigkeit fast schon ebenso stark herabsetzen wie drei ganze Prozent.

3. Es bestätigt sich, was aus den Dampfdruckisothermen bei Interpolation gegen 100% relative Luftfeuchtigkeit zu erwarten war, nämlich dass ein mit Formaldehydgas richtig durchgegerbtes Casein ein deutlich geringeres Quellungsvermögen in Wasser zeigt als ein nassgegerbtes Präparat mit annähernd gleich viel Formaldehyd.

III. Diskussion der Quellungsversuche.

Wenn man versuchen will, aus den Dampfdruckisothermen und aus der maximalen Quellung Rückschlüsse auf den Gerbprozess selber zu ziehen, so ist es nötig, einige wichtige Tatsachen, die Quellung im allgemeinen betreffend, in Erinnerung zu rufen. Als Ursache für die Quellung kommen in Frage:

1. Die Betätigung molekularer Anziehungskräfte zwischen den Molekeln der beiden Phasen, welche zu einer Abnahme der potentiellen Energie führt; und

2. die Tendenz zur wahrscheinlichsten Verteilung der Molekeln (Zunahme der Entropie) oder m. a. W. das osmotische Verdünnungsbestreben des quellenden Körpers.

Molekulare Anziehungskräfte treten besonders bei der Wechselwirkung polarer Gruppen und Molekeln in Erscheinung. Die Proteine enthalten zahlreiche stark polare Gruppen (—COOH, —OH, —NH_2, —NH—CO—, —O—PO_3H_2 etc.), welche Wassermolekeln an sich ziehen und richten. Die Begleiterscheinungen der Hydratation dieser Gruppen sind bekannt. Der Vorgang ist stark exotherm und zudem mit einer beträchtlichen Volumkontraktion verbunden. Nach *J. R. Katz* (l. c.) findet für 1 g Wasser, das von einer grossen Menge vollkommen trockenen Caseins aufgenommen wird, eine Kontraktion von 0,39 cm^3 statt. In Eiweissgelen und -lösungen stehen durchschnittlich 0,3 g Wasser pro Gramm Protein für die Lösung anderer Stoffe nicht zur Verfügung (sog. nicht lösender Raum) und gefrieren auch bei starker Abkühlung nicht[1]). Die Bindungskräfte bei der Hydratation sind für die ersten Wassermengen am grössten und werden für die nachfolgenden immer kleiner. Irgendeine stöchiometrisch bedingte Grenze für die Wasserbindung gibt es nicht, denn eigentliche Bindung geht räumlich betrachtet in eine immer schwächer werdende Richtwirkung auf die Wasserdipole über. Immerhin wird man nicht stark fehl gehen, wenn man annimmt, dass beim Casein die Dampf-

[1]) Siehe Buch von *Pauli* und *Valkó*, S. 157 u. f.

druckisotherme von 0 bis ungefähr 50 % relativer Feuchtigkeit fast ausschliesslich das Hydrationsbestreben der polaren Gruppen zum Ausdruck bringt. Dieser Teil der Kurve ist dadurch charakterisiert, dass sein Verlauf, sowohl für gegerbtes wie für ungegerbtes Casein, der *Freundlich*'schen Absorptionsisotherme

$$a = \alpha \cdot p^{1/n}$$ wobei a = adsorbierte Menge, p = Dampfdruck des Adsorbates, α, n = Konstanten ($n < 1$)

folgt.

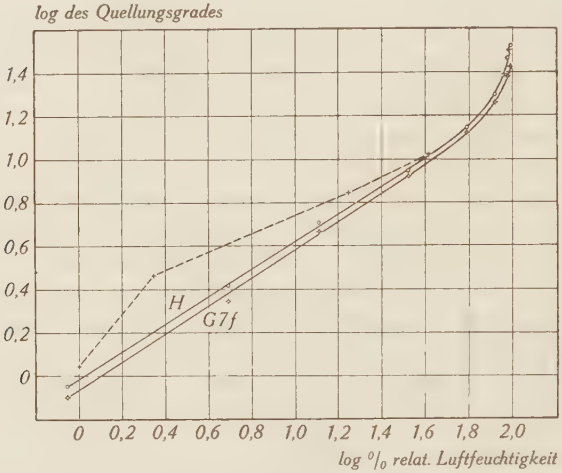


Fig. 4.

Dampfdruckisothermen von ungegerbtem (H) und von gasgegerbtem (G 7 f) Casein. Die gestrichelte Kurve enthält die Werte von *J. R. Katz* für gewöhnliches Casein.

Dies ist ohne weiteres aus Fig. 4 zu erkennen. Wie es die Formel verlangt, verläuft im genannten Gebiet die Isotherme als Gerade, wenn man den Wassergehalt des Caseins sowie den Dampfdruck in logarithmischem Masstab aufträgt[1]). Die schon erwähnte Isotherme von *J. R. Katz*, die hier miteingezeichnet worden ist, zeigt nicht diesen einfachen Verlauf.

Bei relativen Dampfdrucken von 50 % an aufwärts nimmt die Isotherme mehr und mehr einen anderen Verlauf. Hier wird das osmotische Verdünnungsbestreben dominierend. Das Wasser diffundiert nach der Richtung, wo seine Konzentration geringer ist, d. h. in das Gel hinein. Beide Kräfte (Hydratation und Diffusion) ergeben zusammen den Quellungsdruck, der wiederum von *J. R. Katz*[2]) für das Casein nach einer Formel von *H. Freundlich* aus der

[1]) Bekanntlich gilt die *Freundlich*'sche Formel nicht nur für eigentliche Adsorption an Festkörperoberflächen, sondern auch für die Aufnahme von Gasen und Dämpfen durch Flüssigkeiten, wenn starke Kräfte zwischen den Molekeln der beiden Phasen auftreten. Es sei nur an die Systeme Schwefelsäure—Wasser und Phosphorsäure—Wasser erinnert (vgl. *J. R. Katz*, l. c., S. 392). [2]) l. c., S. 385.

Dampfdruckisotherme berechnet worden ist. Seine direkte und exakte Messung bietet wegen der Plastizität des gequollenen Proteins Schwierigkeiten. Er ist umso grösser, je wasserärmer das Gel ist.

Dem Quellungsdruck entgegen wirken die Kohäsionskräfte innerhalb des quellenden Körpers. Auch sie haben verschiedene Ursachen. Es kommen in Frage: Gitterkräfte (sofern geordnete Bezirke vorhanden sind), *van der Waals*'sche Kräfte, Dipolkräfte, Ionenbindungen, Wasserstoffbindungen und schliesslich Hauptvalenzbindungen, welche möglicherweise die Makromolekeln des Stoffes mit einander verknüpfen.

Die Wassermenge, welche ein Protein in Berührung mit flüssigem Wasser oder mit Wasserdampf bis zur Gleichgewichtseinstellung aufnehmen kann, hängt also von einer ganzen Reihe unbekannter Grössen ab, welche im Auge zu behalten sind, wenn wir uns unserer eigentlichen Fragestellung zuwenden, die der quellungsvermindernden Wirkung der Formaldehydgerbung auf das Casein gilt.

1. Wirkt der Formaldehyd dadurch, dass er durch Umwandlung stark wasseraffiner in wasserabstossende Gruppen die Hydratationstendenz des Proteins vermindert?

Die sauren Gruppen (–COOH, –O–PO_3H_2), welche die Aminogruppen an Zahl übertreffen, werden durch den Formaldehyd sicher nicht verändert. Ansatzpunkte sind für diesen im wesentlichen nur die Aminogruppen, sowie die sauren Amidgruppen (–NH–CO–). Wir werden uns in einer folgenden Mitteilung mit den hier in Frage kommenden Reaktionen ausführlich befassen. Jetzt sei nur folgendes festgestellt:

Eine blosse Anlagerung von CH_2O, die zur Bildung einer Methylolgruppe >N–CH_2OH führen muss, wird die Wasseraffinität einer Amino- resp. Amidogruppe durch die Zufügung einer OH-Gruppe höchstens noch unterstützen. Findet Kondensation statt, so kommt die Bildung nachstehender Gruppierungen in Frage: —N–CH_2 und >N–CH_2–N<. Es ist nicht wahrscheinlich, dass dem Stickstoff in diesen Anordnungen die Fähigkeit zur Hydratation völlig genommen sein sollte. Zwar wird der basische Charakter der Aminogruppen durch Formaldehyd vermindert (Grundlage der Formoltitration nach *Soerensen!*), aber andererseits werden die N-Methylen-Verbindungen der Aminosäuren als besonders hygroskopisch beschrieben; sie krystallisieren ebenso wie ihre Salze mit Krystallwasser[1]).

Unabhängig von solchen Betrachtungen muss auch aus der Tatsache, dass die Dampfdruckisothermen von gegerbtem und ungegerbtem Casein bei kleinen relativen Feuchtigkeiten kaum merklich verschieden sind, geschlossen werden, dass die unter 1. formulierte Frage zu verneinen ist. Wenn die Hydratation wesentlich herabgesetzt würde, müsste sich dies gerade bei kleinen Dampfdrucken deutlich bemerkbar machen.

2. Für die Annahme, dass der osmotische Faktor der Quellung durch die Gerbung wesentlich verringert wird, liegen keine Gründe vor.

3. Durch die Gerbung werden die Kohäsionskräfte im quellenden Protein erhöht.

---

[1]) *H. Franzen* und *E. Fellmer*, J. pr. [2] **95**, 299 (1917).

Im trockenen Casein sind die Molekeln vor allem durch die Wechselwirkung ihrer polaren Gruppen miteinander verknüpft. Durch Wasser wird nur ein Teil dieser Haftpunkte gelöst; die Hydratation bewirkt zwar ein Auseinanderdrängen der Molekeln, die Quellung bleibt aber begrenzt. Durch Zusatz von Säuren, Alkalien oder gewissen Salzen lässt sich die Quellung unbegrenzt, d. h. bis zur Lösung weitertreiben. Dass die Kohäsionskräfte sogar bei chemisch vollkommen identischen Systemen recht verschieden sein können, zeigen die Hysteresiserscheinungen bei der Quellung (vgl. Tab. 1). Beim Austrocknen des Gels werden durch das Zusammenpressen der Makromolekeln neue Haftpunkte geschaffen. Deshalb quillt ein solches Gel beim Wiederwässern weniger. Bei der Formaldehydgerbung muss angenommen werden, dass ihre Wirkung nicht oder mindestens nicht in erster Linie auf der Vermehrung der Nebenvalenzhaftpunkte, sondern auf einer Netzbildung zwischen den Molekeln durch Hauptvalenzbindungen beruht. Die Bildung von Methylenbrücken ($> N—CH_2—N <$) bei der Formaldehydgerbung der Proteine ist schon von verschiedenen Forschern angenommen[1]), von andern wieder bestritten[2]), chemisch aber noch nie einwandfrei nachgewiesen worden. Wir werden uns in späterem Zeitpunkt näher mit dieser Frage befassen; zunächst nehmen wir zu ihr nur auf Grund der Quellungserscheinungen Stellung:

a) Die Quellung der durchgegerbten Präparate ist nicht nur in Wasser, sondern auch in allen Caseinlösungsmitteln (verdünnte Alkalien und Säuren, starke Kaliumrhodanid- und konz. Harnstofflösung usw.) begrenzt. Eine Lösung ohne hydrolytischen Abbau ist nicht möglich. Eine Erklärung dieser Tatsache ohne Annahme von Hauptvalenzverknüpfungen ist kaum möglich.

b) Für die maximale Quellung scheint es nicht viel auszumachen, ob bei der Kaltgerbung 1 bis 1,5% Formaldehyd oder mehr aufgenommen wird. Was über 1,5% hinausgeht, beeinflusst die Kohäsion des Gels nicht mehr. Man muss daraus schliessen, dass nur diese Menge Formaldehyd sich an der Bildung der Brücken beteiligt. Die Netzbildung zwischen den Makromolekeln im Gel ist also eine verhältnismässig nicht sehr dichte. Die Aufnahme der ersten 10—20% Wasser wird durch sie nur wenig behindert. Die Wirkung der Gerbung wird aber umso deutlicher, je weiter die Quellung fortschreitet. Eine völlige Dispergierung ist nach der Gerbung wie gesagt überhaupt nicht mehr möglich.

4. Vergleich zwischen Nassgerbung und Gasgerbung: Während sich nassgegerbte und gasgegerbte Caseinpräparate bei mässigen Luftfeuchtigkeiten im Wasserbindungsvermögen nicht merklich unterscheiden, treten deutlich Unterschiede zu Tage, wenn man sich 100-proz. relativer Feuchtigkeit nähert. Die Quellfähigkeit von gasgegerbtem Casein ist — wenn man durchgegerbte Präparate mit ähnlichem Formaldehydgehalt vergleicht — merklich geringer.

[1]) Siehe z. B. *A. Künzel*, Angew. Ch. **50**, 308 (1937); *K. H. Gustavson*, Svensk. kem. Tid. **52**, 261 (1940); *Dyachenko* und *Shelpakova*, J. int. Soc. Leather Trades Chemists **23**, 12 (1939).

[2]) *J. H. Highberger* und *F. O'Flaherty*, J. int. Soc. Leather Trades Chem. **23**, 131 (1939).

Erwartungsgemäss treten die Unterschiede noch deutlicher zu Tage, wenn man die Quellung in noch stärker quellend wirkenden Medien als Wasser vor sich gehen lässt. Nachstehend die Sedimentationsvolumina zweier in 0,1-n. NaOH gequollener Präparate (je 0,25 g):

Nassgegerbtes Präparat 38 III mit 3,19% CH_2O: 2,1 cm³
Gasgegerbtes Präparat G 50 mit 2,31% CH_2O: 1,7 cm³.

Der Unterschied im Quellungsvermögen beträgt hier 23,5% bez. auf den Wert des gasgegerbten Präparates.

Es liegt kein Grund zur Annahme vor, dass der Chemismus der Gerbung mit gasförmigem und mit wässrigem Formaldehyd grundsätzlich verschieden sei. Für die Erklärung des von uns beobachteten Effektes gibt es zwei Möglichkeiten:

a) Bei der Gasgerbung werden mehr Methylenbrücken gebildet als bei der Nassgerbung, auch wenn total gleich viel Formaldehyd gebunden wird. Diese Frage wird z. Z. von uns noch experimentell bearbeitet, und wir werden über die Ergebnisse später berichten.

b) Bei der Gasgerbung befindet sich das Proteingel in ungequollenem Zustand. Durch die entstehenden Methylenbrücken wird also eine primär schon dichte Struktur fixiert. Anders bei der Nassgerbung. Beim Einbringen des Caseins in die Formaldehydlösung findet zuerst Quellung statt. Dieselbe verläuft rasch und führt praktisch ebensoweit wie in reinem Wasser. Die sehr viel langsamer verlaufende Gerbung spielt sich also an einem maximal gequollenen Gel ab. Dies ergibt sich sehr klar aus folgenden einfachen Versuchen:

In graduierte Reagenzgläser wurden drei Proben à je 1 g ungegerbtes Casein (eigenes Präparat) abgewogen.

I. Mit 10 cm³ Wasser verrührt, nach beendeter Quellung 20 Stunden stehen gelassen. Sedimentationsvolumen = 4,2 cm³.

Ia. Zu der gequollenen Probe I wurden 10 cm³ 4-proz. Formaldehydlösung gegeben. Sedimentationsvolumen nach 20 Stunden = 4,2 cm³.

II. Casein trocken mit 20 cm³ 2-proz. Formaldehyd verrührt; nach Quellung 20 Stunden stehen gelassen. Sedimentationsvolumen = 4,2 cm³.

III. Wie II, aber mit 38-proz. Formaldehyd. Sedimentationsvolumen = 4,3 cm³.

Durch die Einwirkung des Formaldehyds erleidet das gequollene Protein also keine direkte Kontraktion. Für die Quellung macht sich die Gerbung erst bemerkbar, wenn das Präparat einmal getrocknet worden ist, indem dann bei erneuter Quellung das ursprüngliche Volumen nicht mehr erreicht wird.

a Fig. 5. b

Schema der Nassgerbung (a gequollenes Gel) und der Gasgerbung (b entquollenes Gel) mit Formaldehyd. Die kleinen Kreise bedeuten Methylenbrücken.

In Fig. 5 ist unter extremer Schematisierung versucht worden, den wesentlichen Unterschied der Gerbung eines gequollenen und eines entquollenen, trockenen Caseingels darzustellen. Im gequollenen Gel (a) berühren sich die Caseinteilchen, die wir uns als

langgestreckte Pakete von Fadenmolekeln vorstellen können[1]), hauptsächlich nur mit ihren Enden. Die Bildung von Methylenbrücken zwischen den Teilchen ist natürlich nur an diesen Berührungsstellen möglich. Weitere Brücken können sich noch innerhalb der Teilchen bilden; diese verhindern aber nicht, dass das dreidimensionale Hauptvalenznetz, welches sich bei der Gerbung im gequollenen Zustand bildet, sehr weitmaschig ist. Im entquollenen oder trockenen Gel (b) sind die Proteinteilchen auch mit ihren Seiten eng aneinander gepresst. Die statistisch über die Berührungsstellen verteilten Brückenbindungen ergeben ein viel engmaschigeres Netz, das in Wasser wohl etwas quellen kann, aber lange nicht so stark wie das Gel a.

Zusammenfassung.

Die bekannte Erscheinung, dass das Quellungsvermögen der Proteine durch eine Behandlung mit Formaldehyd herabgesetzt wird, wurde am Beispiel des Caseins näher untersucht. Es wurde das Wasserbindungsvermögen von verschieden gegerbtem und ungegerbtem Casein in Abhängigkeit vom relativen Wasserdampfdruck der Gleichgewichtsatmosphäre bestimmt (Dampfdruckisothermen). Durch die Gerbung wird das Wasserbindungsvermögen herabgesetzt; der Effekt ist umso stärker, je grösser der relative Wasserdampfdruck ist. Im Gebiete über 50% relativer Feuchtigkeit zeigt sich zudem, dass mit Formaldehyddampf behandeltes Casein („Gasgerbung") weniger Wasser aufnimmt als solches, das mit wässriger Lösung gehärtet worden ist. Auch die maximale Quellung, erreicht durch Einbringen in Wasser, ist bei gasgegerbtem Casein geringer als bei nassgegerbtem. Bei beiden Gerbmethoden ist das Maximum der quellungsvermindernden Wirkung bereits erreicht, wenn der Gehalt des Caseins an gebundenem Formaldehyd 1 bis 1,5% beträgt. Es wird eine einfache Methode für vergleichende Messungen der maximalen Quellung in Vorschlag gebracht, bei der die Menge des Gelwassers nach Abzentrifugieren des bloss anhaftenden Wassers gravimetrisch bestimmt wird.

Die für den eigentlichen Gerbeffekt (verminderte Quellfähigkeit) verantwortliche Reaktion wird angesehen als eine hauptvalenzmässige Verknüpfung der Proteinmolekeln durch den Formaldehyd. Die Tatsache, dass die Gasgerbung der Nassgerbung hinsichtlich des Gerbeffektes überlegen ist, findet ihre Erklärung darin, dass während der ersteren das Proteingel nur sehr wenig gequollen ist und somit ein engmaschigeres Hauptvalenzraumnetz gebildet wird als bei der Nassgerbung, die sich stets an einem stark gequollenen Proteingel abspielt.

Bern, Chemisches Institut der Universität,
Organische Abteilung.

[1]) Vgl. hierzu *Hs. Nitschmann* und *H. Guggisberg*, Helv. **24**, 434, 574 und spez. 586 (1941).

Sonderabdruck aus
HELVETICA CHIMICA ACTA
Volumen XXVII Fasciculus Secundus.

32. Die Umsetzung des Caseins mit Formaldehyd. V. Über das Verhalten der ε-Aminogruppen des Lysins und der Peptidgruppen

von **Hs. Nitschmann** und **H. Hadorn.**

(20. I. 44.)

Einleitung.

In der IV. Arbeit dieser Publikationsreihe[1]) wurde der Einfluss der Formaldehydgerbung auf das Quellungsvermögen des Caseins näher untersucht. Es wurde dort bereits darauf hingewiesen, dass die Verminderung des Quellungsvermögens in Wasser und die Unlöslichkeit gegerbten Caseins in Caseinlösungsmitteln, wie verdünnter Natronlauge, starker Harnstoff- oder Calciumrhodanidlösung usw. durch die Theorie der Brückenbildung erklärt werden kann. In der Tat ist die Bildung von $-CH_2-CH_2-$-Brücken bei der Formaldehydgerbung der Proteine bereits von verschiedenen Forschern angenommen und diskutiert, jedoch nie experimentell bewiesen worden.

Eine fast lückenlose Zusammenstellung der diesbezüglichen Arbeiten hat neuestens *Gustavson*[2]) in seiner Publikation „Die Natur der Formaldehyd-Verbindungen der Eiweisskörper" gegeben. Wir können uns deshalb damit begnügen, nur noch auf jene Arbeiten einzugehen, die zu unseren eigenen Untersuchungen in einer näheren Beziehung stehen. Der erste Autor, der die Bildung von Methylenbrücken bei der Formaldehydgerbung annahm, war *K. H. Meyer*[3]). *Küntzel*[4]) hat den Gedanken dahin präzisiert, dass Peptidgruppen sich berührender Eiweissmolekeln durch $-CH_2-CH_2-$-Brücken verknüpft werden sollen. Den experimentellen Beweis hiefür hat er nicht erbracht. *Highberger* und *O'Flaherty*[5]) sowie *Holland*[6]) wiederum erachten nach ihren quantitativen Versuchen die *Küntzel*'sche Brückentheorie als unwahrscheinlich. Die erste Arbeit, in der der experimentelle Nachweis der Methylenbrücken erbracht werden sollte, stammt von *Dyachenko* und *Shelpakowa*[7]). Da von diesen Autoren die Formaldehydgerbung gerade am Casein untersucht wurde, soll gezeigt werden, dass der Beweis in Wirklichkeit nicht erbracht worden ist. Gegerbt wurde ausschliesslich in wässeriger 3-proz. Formaldehydlösung. Die Gerbdauer betrug immer 5 Tage. Variiert wurde das p_H der Gerblösung. Dabei wurde die Beobachtung gemacht, dass bei höherm p_H mehr Formaldehyd gebunden wird, was sich vollständig mit den Angaben einer Reihe anderer Forscher deckt. Den Schluss, dass bei neutraler oder schwach saurer Reaktion der Gerblösung zwischen je zwei primären Aminogruppen eine Methylenbrücke gebildet wird, ziehen die genannten Autoren aus folgenden zwei Experimenten:

1. wurde der vom Casein gebundene Formaldehyd analytisch bestimmt;

2. wurde das OH'-Bindungsvermögen von unbehandeltem und von gegerbtem Casein bestimmt.

[1]) Helv. **26**, 1084 (1943).
[2]) Koll. Z. **103**, 43 (1943).
[3]) Bioch. Z. **208**, 23 (1929).
[4]) Angew. Chem. **50**, 308 (1937).
[5]) J. int. Soc. Leather Trades Chemists **23**, 549 (1939).
[6]) J. int. Soc. Leather Trades Chemists **23**, 215 (1939).
[7]) J. int. Soc. Leather Trades Chemists **23**, 12 (1939).

Auf 2 Aminogruppen soll ein Mol CH_2O gebunden werden. Zudem soll der Verlust an OH′-Bindungsvermögen bei der Gerbung gerade der Anzahl der Aminogruppen äquivalent sein, woraus geschlossen wird, dass diese alle zur Gruppierung —NH—CH_2—NH— umgesetzt werden. Das OH′-Bindungsvermögen des rohen Caseins wurde durch Titration mit Natronlauge und Phenolphtalein bis zur Rotfärbung (p_H ca. 10) bestimmt. Das gegerbte Casein dagegen wurde mit einem Überschuss an 0,1-n. Natronlauge (p_H = 13) behandelt; dieser wurde nach dem Filtrieren zurücktitriert. Im zweiten Falle bestimmt man das maximale OH′-Bindungsvermögen, im letzten Falle aber nicht[1]). Die beiden Werte dürfen deshalb nicht miteinander verglichen werden. Überhaupt kann man auf diesem Wege nicht zum Ziel gelangen, da ja die Aminogruppen durch die Methylenbrückenbildung ihren basischen Charakter keineswegs vollständig verlieren.

Ferner muss festgestellt werden, dass die Analysenmethode, nach welcher *Dyachenko* und *Shelpakowa* den gebundenen Formaldehyd bestimmten, zu niedrige Werte liefert. Durch blosses Destillieren mit Wasser ohne Säurezusatz gelingt es nie, den Formaldehyd quantitativ abzuspalten[2]). Eine Formaldehydbestimmung, die wir genau nach den Angaben der genannten Autoren ausführten, ergab nur 83% des wirklich gebundenen Formaldehyds. Sämtliche Analysenwerte sind daher um rund 20% zu niedrig.

Schliesslich sind die Bedingungen, unter welchen die Verfasser gerben, willkürlich gewählt. Man braucht nur die Konzentration der Gerblösung oder die Gerbzeit zu verändern, um völlig andere Werte für den gebundenen Formaldehyd zu erhalten[3]). Das stöchiometrische Verhältnis zwischen gebundenem Formaldehyd und Aminogruppen im Casein ist hier also rein zufällig wie 1 : 2.

Sehr gründlich hat sich *Gustavson*[4]) mit der Formaldehydgerbung des Kollagens beschäftigt. Seine Versuche führen ihn zu einer Deutung der Gerbwirkung des Formaldehydes, die sich recht weitgehend mit unseren eigenen deckt. *Gustavson* fand, dass beim p_H 7—8 aus 1—2-proz. Formaldehydlösung leicht 0,40 bis 0,45 Mol CH_2O pro g Kollagen aufgenommen werden. Das entspricht ziemlich genau dem Lysingehalt. Bei höherem p_H binden auch die Argininreste noch Formaldehyd. Bei höher konzentrierten Formaldehydlösungen nehmen sogar noch die Peptidgruppen Formaldehyd auf. Die eigentliche Gerbwirkung des Formaldehyds (Erhöhung der Schrumpfungstemperatur, Resistenz gegen Trypsin, Verminderung des Schwellungsgrades) ist strikte an die Anwesenheit der ε-Aminogruppen des Lysins gebunden. Entfernt man diese mit salpetriger Säure, so kann das desaminierte Kollagen wohl noch Formaldehyd aufnehmen, eine Gerbung wird dadurch aber nicht mehr bewirkt. Für *Gustavson* besteht die Gerbung in einer Netzbildung zwischen den Proteinmolekeln, und er schreibt auf S. 47 seiner letzten Arbeit (loc. cit.): „Die Vernetzung der Kollagenketten muss demnach an den ε-Aminogruppen der Lysinreste lokalisiert werden, wahrscheinlich durch Querbindungen benachbarter Aminogruppen naheliegender Ketten." *Gustavson* hat nur mit Kollagen gearbeitet. Man ist aber von vornherein geneigt, anzunehmen, dass der Gerbprozess bei anderen Proteinen analog verläuft. Wir waren deshalb überrascht, als wir lasen[5]), dass *E. Waldschmidt-Leitz* in einem Vortrag für die Formaldehydhärtung des Caseins eine ganz gegenteilige Ansicht vertreten hat. Er glaubt, durch fermentativen Abbau von gehärteten Caseinfasern und adsorptive Trennung der Spaltprodukte bewiesen zu haben, dass die freien Aminogruppen der Diaminocarbonsäuren bei der kalten Gerbung (30°) überhaupt keinen Formaldehyd binden, oder diesen schon beim Waschen mit kaltem Wasser sehr leicht wieder abspalten. Als Bindungsstelle für Methylenbrücken komme einzig die Peptidgruppe in Frage. Nur für die Gerbung bei 70° räumt der genannte Autor die Möglichkeit einer stabilen Bindung an den freien Aminogruppen ein.

[1]) Die beiden Autoren haben übrigens selbst durch potentiometrische Titration für rohes Casein festgestellt, dass die OH′-Bindung erst bei p_H 11,28 beendet ist.

[2]) Vgl. I, *Nitschmann* und *Hadorn*, Helv. **24**, 237 (1941).

[3]) Vgl. III, *Nitschmann* und *Hadorn*, Helv. **26**, 1075 (1943).

[4]) Svensk kem. Tid. **52**, 261 (1940); Koll. Z. **103**, 43 (1943).

[5]) Zellwolle, Kunstseide, Seide **46**, 444 (1941); Referat.

Angesichts dieser sich widersprechenden Ansichten sollte für das Casein die Frage abgeklärt werden, welche Gruppen im Protein mit dem Formaldehyd reagieren. Im folgenden bringen wir einen ersten Beitrag zu diesem Fragenkomplex. Insbesondere soll hier versucht werden, die Annahme der Methylenbrückenbildung, zu der wir beim Studium der Quellung gegerbter Caseine sozusagen gezwungen wurden, experimentell zu stützen.

I. Die Formaldehydbindung durch die freien Lysinaminogruppen.

Dieselbe lässt sich durch den quantitativen Vergleich der Formaldehydaufnahme von gewöhnlichem und von desaminiertem Casein ermitteln. Wir bereiteten uns Desaminocasein ungefähr nach *Dunn* und *Lewis*[1]) wie folgt:

50 g Casein[2]) wurden in einem Stutzen in 1 Liter Wasser suspendiert. Unter kräftiger Rührung wurde langsam 70 cm³ Eisessig zugetropft. Das Casein löste sich dabei zu einer trüben, viskosen Lösung. Nun wurde 250 cm³ 8-proz. Natriumnitritlösung zugetropft. Unter Gasentwicklung fiel das Casein langsam wieder aus. Das Produkt war intensiv zitronengelb gefärbt, was auf eine weitergehende Einwirkung der salpetrigen Säure deutet (Nitrosierung). Das Reaktionsgemisch wurde nun 3 Tage lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde durch ein Glasfilter filtriert und zunächst mit kaltem, dann mit heissem Wasser gewaschen. Dabei wurde Gasentwicklung beobachtet und das Präparat färbte sich bräunlich. Zum Schluss wurde mit Alkohol gewaschen und an der Luft getrocknet. Das getrocknete Desaminocasein hatte eine gelbbraune Farbe.

Die Menge der bei der Desaminierung in OH-Gruppen übergeführten Aminogruppen wurde aus der Verminderung des Säurebindungsvermögens[3]) und des nach *van Slyke* bestimmbaren Aminostickstoffes[3]) berechnet. Die Werte sind in guter Übereinstimmung (Tab. 1). Sie entsprechen zudem ungefähr dem Wert, den *van Slyke*[4]) für den Lysingehalt des Caseins gefunden hat (7,72 % entspr. 60 Millimol/g). Natives und desaminiertes Casein wurden nun unter genau gleichen Bedingungen gegerbt, ausgewaschen und getrocknet und die Differenz des Formaldehydgehaltes dieser Präparate bestimmt[5]).

Wir fanden, dass für jede zerstörte Lysinaminogruppe annähernd, aber nicht ganz eine Molekel Formaldehyd weniger gebunden wird, wenn man 24 Stunden bei Zimmertemperatur mit 10-proz. Formaldehydlösung gerbt[6]). Da unter solchen Bedingungen — wie gleich noch gezeigt wird — im nativen Casein ein kleinerer Teil der Aminogruppen unumgesetzt bleibt, kommt man zum Schluss, dass Formaldehyd und Aminogruppen im Verhältnis 1 : 1 miteinander

[1]) J. Biol. Chem. **49**, 327 (1921).

[2]) Betr. dessen Herstellung siehe III, loc. cit.

[3]) Betr. Ausführung dieser Bestimmungen vgl. den Anhang, S. 310.

[4]) J. Biol. Chem. **16**, 531 (1914).

[5]) Analysenmethode siehe II, *Nitschmann* und *Hadorn*, Helv. **26**, 1069 (1943).

[6]) Diese Behandlung genügt zur Erreichung des maximalen Gerbeffektes in Bezug auf die Quellung; vgl. IV, loc. cit.

reagieren. Dieses Ergebnis wird durch die Tatsache nicht widerlegt, dass bei sehr langdauernder Gerbung (30 Tage, 10-proz. Lösung) Casein und Desaminocasein fast gleich viel Formaldehyd binden. Die OH-Gruppen im letzteren binden mit der Zeit ebenfalls Formaldehyd, so dass die Differenz immer kleiner wird.

Tabelle 1.

Messung	Casein (I)	Desamino-casein (II)	Differenz (I—II)
Säurebindungsvermögen in Millimol/g	0,763	0,263	0,500
van Slyke-Stickstoff —NH_2 in Millimol/g	0,597	0,102	0,495
CH_2O gebunden in %	2,18	0,96	1,22
CH_2O gebunden in Millimol/g . .	0,726	0,32	0,406
(Gerbung 48 Std. mit 10-proz. CH_2O, 24 Std. gewaschen)			
CH_2O gebunden in %	3,42	3,10	0,32
CH_2O gebunden in Millimol/g . .	1,14	1,033	0,166
(Gerbung 30 Tage mit 10-proz. CH_2O, 24 Std. gewaschen)[1])			

Beim Kollagen kommen auf Grund analoger Versuche *Bowes* und *Pleass*[2]) sowie *Highberger* und *O'Flaherty*[3]) zum selben Schluss wie wir, nämlich dass das Bindungsverhältnis von Lysinaminogruppen zu Formaldehyd 1 : 1 beträgt.

Der Nachweis der Formaldehydbindung durch die Lysinaminogruppen ist zunächst indirekt erbracht worden. Es sollte nun noch versucht werden, im gegerbten Casein die Zahl der umgesetzten Aminogruppen auch direkt zu bestimmen.

Aus der Veränderung des H'-Bindungsvermögens bei der Gerbung lässt sich dieser Wert ebensowenig ermitteln wie aus der Veränderung des OH'-Bindungsvermögens[4]). Durch die Bindung von Formaldehyd in dieser oder jener Weise verlieren die Aminogruppen ihren Basencharakter nicht vollständig. Deshalb ist es ganz erwartungsgemäss, wenn die gegerbten Caseine bei einem Säurezusatz, der bei gewöhnlichem Casein die maximale H'-Bindung bewirkt, etwas weniger Wasserstoffionen binden als das letztere, wobei die Differenz aber lange nicht der Anzahl umgesetzter Aminogruppen äquivalent ist.

[1]) Bei erschöpfendem Auswaschen (vgl. III. loc. cit.) bleibt die Differenz fast gleich.
[2]) J. int. Soc. Leather Trades Chemists **23**, 453 (1939).
[3]) J. int. Soc. Leather Trades Chemists **23**, 549 (1939).
[4]) Vgl. Einleitung.

Aufschlussreicher ist die Bestimmung des *van Slyke*-Stickstoffes in den gegerbten Caseinen. Mit salpetriger Säure reagiert bekanntlich nur die primäre ε-Aminogruppe der Lysinreste unter Stickstoffentwicklung. Im gegerbten Protein ist diese Gruppe zum Teil durch Formaldehyd blockiert und nach der Methode von *van Slyke* nicht mehr erfassbar. Aus der Differenz der Werte von unbehandeltem Casein und gegerbtem Casein lässt sich die Menge der mit Formaldehyd umgesetzten Aminogruppen bestimmen.

In Tabelle 2 sind diese Werte für einige verschieden gegerbte Caseine zusammengestellt.

Tabelle 2.

Präparat-Nr.	Gerbung	Gesamt-CH_2O in %	*Van Slyke*-N in Millimol/g	Blockierte NH_2-Gruppen in Millimol/g
Casein	keine	0	0,597	0
38 I	1 Tag 38-proz. CH_2O-Lösung, kalt, „normal" gewaschen[1])	1,91	0,186	0,411
10 III	28 Tage 10-proz. CH_2O-Lösung, kalt, „normal" gewaschen	2,33	0,209	0,388
10 I 70°	1 Tag 10-proz. CH_2O-Lösung, bei 70°, „normal" gewaschen	5,21	0,083	0,514
G 50 AW	50 Tage Gasgerbung, „erschöpfend" gewaschen	1,81	0,194	0,403
10/21943	2 Tage 10-proz. CH_2O-Lösung, kalt, 24 St. ausgewaschen	2,18	0,230	0,367

Man sieht, dass durch die Formaldehydgerbung tatsächlich der grösste Teil der nach *van Slyke* erfassbaren Aminogruppen blockiert wird. Die Umsetzung ist allerdings nicht quantitativ; ein beachtlicher Teil der NH_2-Gruppen, dessen Grösse etwas von den Gerbbedingungen abhängt, wird vom Formaldehyd nicht erfasst. Die Einbusse an freien Lysinaminogruppen beträgt bei der Gerbung in der Kälte ca. 0,4 Millimol/g, d. h. reichlich $^2/_3$ der total vorhandenen Menge. Das in Tab. 2 zuletzt aufgeführte Präparat ist dasselbe wie dasjenige in Tab. 1 (3. Horizontalreihe von oben, I). Wenn auch der erwartete Wert von 0,4 hier nicht ganz erreicht wird, so ist die Übereinstimmung doch immerhin so gut, dass man sie als Bestätigung für unsern Schluss ansehen darf, dass im grossen gesehen auf jede umgesetzte Aminogruppe eine Molekel Formaldehyd kommt.

[1]) Über das Auswaschen vgl. III, loc. cit.

II. Zur Frage der Methylenbrücken. Nachweis einer Kondensation bei der Formaldehydbindung.

Für die Bindung des Formaldehyds durch die Lysinaminogruppen kommt entweder Anlagerung oder Kondensation in Frage. Im ersteren Falle würde eine Methylolverbindung $R–NH–CH_2OH$ gebildet. Bei Kondensation bleibt die Möglichkeit, dass ein Azomethin $R–N=CH$ entsteht, oder dass eine Methylenbrücke zwischen einer Aminogruppe und einer anderen reaktiven Gruppe gebildet wird (z. B. $–NH–CH_2–N<$). Die so ausserordentlich einleuchtende Brückentheorie würde eine sehr starke experimentelle Stütze erhalten, wenn es gelänge, den Nachweis für die Kondensation zu erbringen, denn die Bildung der Azomethingruppe ermöglicht keine Erklärung des Gerbeffektes[1]).

Der Nachweis, dass bei der Formaldehydgerbung des Caseins tatsächlich eine Kondensation von Wasser stattfindet, konnte recht einfach folgendermassen erbracht werden: An genau gewogenen Caseinproben wurde die durch die Gerbung bewirkte Gewichtszunahme ermittelt. Bei der Gerbung mit Formaldehydgas[2]) ist das besonders leicht möglich. Im gegerbten Casein wurde ausserdem der gebundene Formaldehyd analytisch ermittelt. Wäre der gesamte Formaldehyd in Methylolform gebunden (Addition ohne Kondensation), so müssten die beiden Werte übereinstimmen. Bei einer Kondensation wird der Wert für die Gewichtszunahme um die kondensierte Wassermenge zu niedrig gefunden. Aus dieser Differenz lässt sich der als Methylen gebundene Formaldehydanteil berechnen.

Die Caseinproben (0,3 g) wurden zunächst in kleinen Wägegläsern über konz. Schwefelsäure vorgetrocknet und anschliessend im Hochvakuum (0,06 mm) neben Phosphorpentoxyd bis zur Gewichtskonstanz weiter getrocknet. Die Gerbung erfolgte bei Zimmertemperatur in einem kleinen Exsikkator über 38-proz. Formaldehydlösung. Die Gerbzeit betrug 28 Tage. Die Wägegläser wurden offen in den Exsikkator gestellt. Durch gelegentliches vorsichtiges Drehen wurde das Casein durchgemischt, damit die Gerbung möglichst gleichmässig erfolge. Nach beendeter Gerbung wurden die Gläser 14 Tage offen an der Luft stehen gelassen, bis kein Formaldehydgeruch mehr wahrnehmbar war. Das Trocknen der Probe erfolgte in genau gleicher Weise wie vor der Gerbung. Nachdem die bei der Gerbung erfolgte Gewichtszunahme festgestellt war, wurde die gesamte Probe quantitativ in einen Destillierkolben gespült und der gebundene Formaldehyd genau bestimmt. Die gefundenen Werte sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Dieser Versuch beweist, dass tatsächlich ein beträchtlicher Teil des Formaldehyds (ca. 0,46 Millimol/g) unter Kondensation gebunden wurde. Die gefundenen Werte stimmen recht gut mit der durch die Lysinaminogruppen gebundenen Formaldehydmenge überein. Dieselbe beträgt nach den Versuchen der Tabelle 1 und 2 ca. 0,4 Milli-

[1]) Vgl. IV, loc. cit. Die Existenz von Azomethinen des Formaldehyds ist überhaupt fraglich. Jedenfalls sind die Formaldehydverbindungen der Aminosäuren sehr wahrscheinlich Methylolverbindungen. *Franzen* und *Fellmer* (J. pr. [2], **95**, 299 (1917)), die sie hergestellt und untersucht haben, bezeichnen sie zwar als Methylenverbindungen, geben aber an, dass alle mit Wasser krystallisieren und sehr hygroskopisch sind.

[2]) Vgl. III, loc. cit.

mol g. Erinnern wir uns noch daran, dass das Maximum des Gerbeffektes (Verminderung der Quellfähigkeit[1]) ebenfalls bereits mit 1,5 % CH_2O resp. 50 Millimol g erreicht ist, so können wir feststellen, dass alles dafür spricht, dass es gerade die Lysinaminogruppen und nur diese sind, welche Formaldehyd unter Bildung von Methylenbrücken binden und somit die eigentliche Gerbung bewirken. Bei der Gerbung von Desaminocasein, das auch beträchtlich Formaldehyd zu binden vermag, musste demnach keine Kondensation stattfinden. Diese Erwartung wurde bestätigt. Die Kondensation machte bei wie zuvor beschriebener Gasgerbung nur 0,07 Millimol g (entsprechend 0,22 % CH_2O) aus. Dieser kleine Betrag dürfte auf die nicht vollständige Desaminierung unserer Präparate zurückzuführen sein; er liegt im übrigen fast innerhalb der Fehlergrenze.

Tabelle 3.

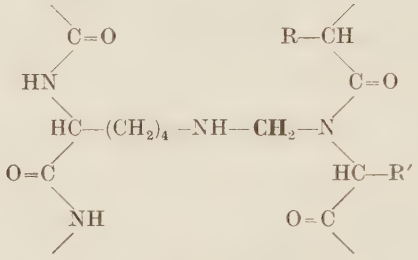
	Versuch I	Versuch II
Caseingewicht vor der Gerbung	0,3262 g	0,3307 g
Caseingewicht nach der Gerbung	0,3352 g	0,3395 g
Gewichtszunahme	0,0090 g	0,0088 g
Gew.-Zunahme in % (Gew. n. Gerbg. = 100)	2,69 %	2,59 %
Die Analyse ergab: CH_2O in g	0,01186 g	0,01152 g
in Prozenten	3,54 %	3,39 %
CH_2O als Methylol gebunden	2,11 %	2,06 %
CH_2O als Methylen gebunden	1,43 %	1,33 %
CH_2O als Methylen geb. in Millimol/g	0,476	0,443

Die Gasgerbung ist für den Nachweis der Kondensation besonders geeignet, weil man das Casein nicht auszuwaschen braucht, Substanzverluste also ganz ausgeschlossen sind. Bei der Nassgerbung (10-proz. Formaldehydlösung, 24 Stunden, Zimmertemperatur) liess sich Kondensation ebenfalls nachweisen, jedoch streuten die Werte stärker und lagen zudem etwas tiefer (0,8—1,3 % CH_2O resp. 0,266 bis 0,433 Millimol g als Methylen). Das ist nicht verwunderlich. Beim Auswaschen der gegerbten Präparate sind, auch wenn es nur kurz dauert, kleinere Caseinverluste unvermeidlich[2]). Deshalb müssen die für den kondensierten Formaldehyd gefundenen Werte eher zu klein herauskommen. Immerhin stimmt wenigstens der höchste der gefundenen Werte mit der unter gleichen Gerbbedingungen durch die Lysinaminogruppen gebundenen Formaldehydmenge recht gut überein.

Für die an den Lysinaminogruppen ansetzenden Methylenbrücken stellt sich nun die Frage, zu welchen anderen Gruppen im Protein sie reichen. Da pro Lysinaminogruppe 1 Mol Formaldehyd

[1]) Vgl. IV, loc. cit. [2]) Das Waschwasser schäumt!

gebunden wird, kommt eine gegenseitige Verknüpfung der Aminogruppen durch $—CH_2—$ nicht in Frage, denn diese Reaktion würde nur ein halbes Mol Formaldehyd verbrauchen. Sie kann sich deshalb höchstens in untergeordnetem Masse abspielen. Da im Casein nur ca. jede 13. Aminosäure Lysin ist, wäre es zudem sehr unwahrscheinlich, dass sich alle diese weit verstreuten Aminogruppen zur gemeinsamen Brückenbildung finden könnten. Es bleibt kaum eine andere Möglichkeit, als dass im gegerbten Casein die Methylenbrücken je eine Lysinaminogruppe und eine Peptidgruppe entsprechend folgender Formel miteinander verknüpfen:



Diese Art der Brückenbildung ist schon deshalb die wahrscheinlichste, weil jede Lysinaminogruppe im Proteingel von zahlreichen Peptidgruppen umgeben ist. Zudem ist die Peptidgruppe für sich allein befähigt, Formaldehyd zu binden, wie wir noch zeigen werden.

III. Zur Frage der Bindung von Polyoxymethylenhydrat.

Bei kräftiger, langdauernder Gerbung vermag Casein wie auch Kollagen bedeutend mehr Formaldehyd zu binden, als den freien Aminogruppen entspricht[1]). Auch desaminiertes Casein bindet unter diesen Bedingungen beträchtliche Mengen Formaldehyd. Wir bestätigen mit dieser Feststellung nur, was andere Forscher schon vor uns gefunden haben[2]). Man hat also damit zu rechnen, dass noch weitere Gruppen im Protein Formaldehyd binden. Von anderer Seite[3]) ist ausserdem versucht worden, die höheren Formaldehydgehalte gegerbter Proteine damit zu erklären, dass ausser monomerem Formaldehyd auch Formaldehydpolymerisate gebunden worden sind. Wenn diese Annahme auch nicht bewiesen wurde, so kann sie doch nicht ohne weiteres von der Hand gewiesen werden. Neutrale und schwach saure Formaldehydlösungen höherer Konzentration enthalten reich-

[1]) Vgl. III, loc. cit.

[2]) *Bowes* und *Pleass*, J. int. Soc. Leather Trades Chemists, **23**, 451 (1939); *Highberger* und *O'Flaherty*, J. int. Soc. Leather Trades Chemists **23**, 549 (1939); *Highberger* und *Retzsch*, J. Amer. Leather Chem. Assoc. **34**, 131 (1939); *Csürös* und *Turai-Lichtig*, Magyar Chem. Folyoirat **45**, 54 (1939).

[3]) *Highberger* und *Retzsch*, J. Amer. Leather Chem. Assoc. **34**, 131 (1939).

lich Polymerisationsprodukte des Formaldehyds. Ferner sind Aminosäure-Formaldehyd-Verbindungen bekannt, in denen mehrere (meist drei) Molekel Formaldehyd an die Aminogruppe gebunden sind[1]). In einer früheren Arbeit[2]) haben wir beschrieben, dass gegerbte Caseine beim Auswaschen mit kaltem Wasser während langer Zeit beträchtliche Mengen Formaldehyd abgeben. Es wurde zunächst vermutet, dass es sich dabei um gebundene Polyoxymethylene handle, die allmählich hydrolytisch abgespalten würden[3]). Die Frage wurde daher näher untersucht.

Eine Probe (0,1 g) von festem Polyoxymethylen, das sich aus einer 38-proz. Formaldehydlösung bei längerem Stehen abgeschieden hatte, löste sich in Wasser (50 cm³) in 5 Tagen fast vollständig auf. Die hydrolytische Abspaltung von Formaldehyd aus gegerbtem Casein erfolgt viel langsamer (bis zu 3 Wochen beobachtet). Dies deutet bereits darauf hin, dass es sich nicht um den gleichen Vorgang handeln kann. Sehr deutlich wird das unterschiedliche Verhalten von Polyoxymethylen und gegerbtem Casein bei der Wärmebehandlung.

Um einen Anhaltspunkt über die Geschwindigkeit der Depolymerisation zu erhalten, erwärmten wir eine Probe von 0,1 g Polyoxymethylen in der Trockenpistole unter Evakuieren (14 mm Hg) auf 78°. Als Absorptionsmittel für den abgespaltenen Formaldehyd diente Chromschwefelsäure. Der Gewichtsverlust betrug:

nach 1 Stunde = 37%
„ 2½ Stunden = 59%
„ 11 Stunden = 91%.

In 38-proz. Formaldehyd gegerbte Caseine spalten unter gleichen Bedingungen nur sehr wenig ihres gebundenen Formaldehyds ab (vgl. Tab. 4). Dabei ist zwischen nur ganz kurz und „erschöpfend" ausgewaschenem Casein kein Unterschied feststellbar. Bei den auswaschbaren Formaldehydanteilen kann es sich also nicht um Polyoxymethylene handeln.

Wenn durch diese Versuche auch nicht sicher bewiesen ist, dass vom Protein keine Polyoxymethylenmolekeln gebunden werden können, so scheint dies doch zum mindesten recht unwahrscheinlich.

Tabelle 4.

Casein-Nr.	Dauer der Erwärmung	% CH_2O der Probe vor Erwärm.	% CH_2O der Probe nach Erwärm.	Verlust an CH_2O in % des urspr. Gehaltes	Bemerkungen
38 I a	4 h	2,59	2,60	0	Casein nach der Gerbung nur kurz gewaschen
	18 h	2,59	2,54	1,9	
AW.	18 h	1,78	1,74	2,3	„erschöpfend" (3 Wochen) ausgewaschen

[1]) *Bergman* und *Jacobsohn*, Z. physiol. Ch. **131**, 18 (1923); *Ensslin*, Diss., Zürich.
[2]) Vgl. III, loc. cit.
[3]) Bei kräftiger Gerbung (28 Tage in 38-proz. Formaldehyd) wird allerdings nach erschöpfendem Auswaschen noch 3,03% Formaldehyd gefunden. Diese Menge ist immer noch bedeutend mehr, als was die Aminogruppen binden.

IV. Weitere formaldehydbindende Gruppen im Casein.

Von den übrigen Gruppen im Protein, die für eine Formaldehydbindung in Frage kommen können, wissen wir eigentlich nur vom Argininrest Sicheres. Für das Casein haben *Highberger* und *O'Flaherty*[1]), für das Kollagen hat *Gustavson*[2]) nachgewiesen, dass die Aminogruppe im Guanidinrest des Arginins Formaldehyd bindet, jedoch nur im alkalischen Gebiet. Dies ergibt sich aus dem Vergleich des Formaldehydbindungsvermögens von gewöhnlichem und desarginiertem[3]) Protein bei verschiedenen p_H. Bei unsern Gerbbedingungen (p_H 5—6) kommt somit eine Formaldehydbindung durch die Argininreste nicht in Frage.

Ob die sekundären Aminogruppen von Tryptophan, Histidin, Prolin und Oxyprolin unter den milden Bedingungen der Formaldehydgerbung Formaldehyd binden, ist ungewiss. Entsprechende Verbindungen der genannten Aminosäuren scheinen nie dargestellt worden zu sein. Nur vom Indol, dessen Ringsystem im Tryptophan enthalten ist, berichtet *Annie Homer*[4]), dass es bei 150° in Gegenwart von Zinkchlorid mit Trioxymethylen unter Bildung einer Verbindung $C_{21}H_{20}O_3N_2$ reagiert. Diese Bedingungen sind mit unsern nicht vergleichbar; zudem ist nur sehr wenig Tryptophan im Casein[5]) enthalten.

Gegen eine wesentliche Beteiligung der —NH—-Gruppen in den Heterocyclen spricht noch folgende Überlegung. Leichter als mit Formaldehyd reagieren diese Gruppen sicher mit salpetriger Säure. Mindestens vom Pyrrolidin (enthalten im Prolin) und vom Indol ist die Umsetzung mit salpetriger Säure bekannt[6]). Im Desaminocasein sind demnach diese Iminogruppen durch Nitrosierung blockiert. Trotzdem vermag Desaminocasein noch beträchtliche Mengen Formaldehyd zu binden. So fanden wir in einem Desaminocasein, das 24 Stunden bei 70° mit 10-proz. Formaldehydlösung gegerbt worden war, 3,49% nicht auswaschbaren Formaldehyd.

Dass die Sulfhydrylgruppe des Cysteins leicht über ein weites p_H-Gebiet mit Formaldehyd reagiert, haben *Ratner* und *Clark*[7]) gezeigt. Im Eiweiss findet sich allerdings meist nicht das Cystein, sondern sein Dehydroprodukt, das Cystin. Nach *Bowes* und *Pleass*[8]) soll die —S—S—-Brücke des Cystins durch den Formaldehyd reduktiv gespalten werden. Die dabei entstehende —SH-Gruppe reagiert

[1]) J. int. Soc. Leather Trades Chemists **23**, 549 (1939).

[2]) Svensk kem. Tid. **52**, 261 (1940).

[3]) Eine mindestens teilweise Zerstörung des Guanidinrestes gelingt mit Hypochlorit.

[4]) Biochem. J. **7**, 101 (1912).

[5]) Siehe: *Sutermeister* und *Browne*, Casein and its Industrial Applications. New York 1939.

[6]) Siehe: *Beilstein*, Organische Chemie.

[7]) Am. Soc. **59**, 200 (1937).

[8]) J. int. Soc. Leather Trades Chemists **23**, 451 (1939).

dann natürlich mit Formaldehyd. Der höchste in der Literatur angegebene Wert für den Cystingehalt des Caseins ist 0,34 %[1]). Nun enthält das Casein aber ca. 0,8 % Schwefel. Davon fällt ca. 0,3 % auf Methionin[1]). Die Bindungsart des Restes ist unbekannt. Wenn wir annehmen, dass 0,5 % Schwefel als Cystein oder Cystin vorliegen, so würde dies die Bindung von ebenfalls 0,5 % Formaldehyd ermöglichen. Sogar dieser äusserste Wert ist viel kleiner als das, was über die Bindungsfähigkeit der Aminogruppen hinausgeht. Es müssen also schon noch andere reaktionsfähige Gruppen gesucht werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Reaktion mit Formaldehyd bietet der Phenolkern des Thyrosins. Die Angaben für dessen Gehalt im Casein liegen zwischen 4,5 und 7,5 %. Vom p-Kresol ist bekannt, dass es mit Formaldehyd in den beiden ortho-Stellungen reagieren kann[2]). Hierzu ist jedoch Natronlauge oder konz. Salzsäure als Kondensationsmittel erforderlich. Ohne solche reagiert es, wie auch das Phenol selber, erst bei höherer Temperatur mit merklicher Geschwindigkeit. Mindestens bei den bei fast neutraler Reaktion und Zimmertemperatur ausgeführten Gerbungen ist es deshalb nicht wahrscheinlich, dass der Phenolrest des Tyrosins Formaldehyd bindet. Dagegen wird er bei der Behandlung des Caseins mit salpetriger Säure nitrosiert[3]). Nun kann aber, wie schon ausgeführt, Desaminocasein noch beträchtliche Mengen Formaldehyd binden. Hiefür kann demnach auf keinen Fall das Tyrosin verantwortlich gemacht werden.

Es bleibt somit als formaldehydbindende Gruppe noch die Peptid-Iminogruppe.

Die Annahme, dass auch die Peptidgruppen Formaldehyd binden, ist schon von verschiedenen Autoren gemacht worden[4]). Wir schliessen uns ihnen an, denn folgende Tatsachen sprechen für diese Annahme:

1. *Cherbuliez* und *Feer*[5]) haben gezeigt, dass das Diketopiperazin, welches als eine geeignete Modellsubstanz für die in Frage stehende Reaktion angesehen werden kann, leicht 2 Mol Formaldehyd an den —NH—-Gruppen anlagert zu 1,4-Di-oxymethyl-2,5-diketopiperazin. Die Autoren geben auch eine Zusammenstellung anderer Säureamide, die mit Formaldehyd reagieren.

2. Aus dem Studium des zeitlichen Verlaufes der Formaldehydbindung durch das Casein[6]) geht hervor, dass sich eine rascher und eine langsamer verlaufende Reaktion überlagern. Die Reaktionsge-

[1]) *Sutermeister* und *Browne:* Casein.

[2]) Vgl. z.B. *Köbner,* Angew. Chem. **46,** 251 (1933).

[3]) Hierauf beruht die *Millon*'sche Reaktion. Desaminocasein selber ist gelb und wird mit Alkalien rot. Siehe auch *Wicke,* A. **101,** 317 (1857).

[4]) Siehe *Gustavson,* Koll. Z. **103,** 43 (1943).

[5]) Helv. **5,** 678 (1922).

[6]) Vgl. III, Helv. **26,** 1075 (1943), Fig. 1.

schwindigkeitskurve dieser zweiten Reaktion, die auch nach 30 Tagen noch keineswegs beendet ist, scheint fast linear zu verlaufen[1]). Es muss sich also um eine Reaktion handeln, bei der die Menge der reagierenden Gruppen während der betrachteten Zeitspanne nicht merklich abnimmt. Dies trifft nur für die sehr zahlreichen Peptidgruppen zu, denn wenn dieselben 1,5 % des Caseingewichts an Formaldehyd gebunden haben, so hat erst jede zwanzigste mit einer Molekel Formaldehyd reagiert.

Anhang.

1. Die Bestimmung des Säurebindungsvermögens.

Diese Bestimmung kann dank der Unlöslichkeit des Caseins in verdünnter Schwefelsäure sehr einfach und exakt wie folgt ausgeführt werden:

0,5 g lufttrockenes Casein werden in eine Glasstöpselflasche abgewogen. Nach Zugabe von genau 30 cm³ Schwefelsäure bekannter Konzentration wird verschlossen und 4 Stunden lang bei Zimmertemperatur gerollt. Nach dieser Zeit ist der Gleichgewichtszustand sicher erreicht; er bleibt auch nach 20 Stunden unverändert. Casein und überstehende Flüssigkeit werden dann durch scharfes Zentrifugieren voneinander getrennt und 20 cm³ der letzteren mit Natronlauge und Methylrot als Indikator titriert. Aus dem gefundenen Werte lässt sich berechnen, wieviel Schwefelsäure vom ungelösten Casein gebunden worden ist. Eine Spur Casein geht allerdings in Lösung, jedoch so wenig, dass das Resultat dadurch nicht wesentlich beeinflusst wird.

Die Säurebindung hängt von der Menge, resp. von der Konzentration der zugesetzten Säure ab. Tabelle 5 enthält die Werte, die wir für das von uns hergestellte Casein unter Verwendung von je 30 cm³ Schwefelsäure steigender Konzentration (bis zu 0,05-n.) erhielten.

Tabelle 5.

Milli-Äquivalente H·/g trock. Casein		Milli-Äquivalente H·/g trock. Casein	
zugesetzt	gebunden	zugesetzt	gebunden
0,448	0,392	1,794	0,732
0,897	0,622	2,242	0,763
1,345	0,697	3,363	0,763

Man sieht, dass ein beträchtlicher Überschuss an Säure nötig ist, damit die gesuchte maximale Säurebindung erreicht wird, dass aber noch mehr Säure dieselbe nicht mehr verändert. Wenn die benötigte Säuremenge einmal ermittelt ist, so kann man sich bei weiteren Messungen natürlich mit einem einzigen Ansatz begnügen.

2. Die Bestimmung des *Van Slyke*-Stickstoffes.

Die von *van Slyke* zur Bestimmung primärer aliphatischer Aminogruppen angegebene Methode[2]) konnte von uns nicht unverändert übernommen werden. Sie setzt voraus, dass der zu analysierende Stoff gelöst werden kann, was für gegerbte Caseine unmöglich ist. Wir arbeiten deshalb wie folgt:

Als Reaktionsgefäss verwenden wir eine 50 cm³ fassende Weithalsflasche, die durch einen Gummistopfen verschlossen werden kann, der in vier Bohrungen zwei kleine Tropf-

[1]) Wir sind daran, den zeitlichen Verlauf der Formaldehydbindung weiter, d. h. über ein ganzes Jahr, zu verfolgen.

[2]) Siehe *Houben-Weyl*, Methoden der organischen Chemie, 2. Aufl., Bd. 4, S. 463.

trichter und ein Zuleitungs- und ein Ableitungsrohr für Gas trägt. In diese Flasche werden 0,6 bis 1 g Casein eingewogen. Man setzt 15 cm³ Wasser, 3 cm³ 1-n. Natriumsulfatlösung sowie einen Tropfen Amyl- oder Oktylalkohol zu, schwenkt um, bis alles benetzt ist, und lässt 30 Minuten quellen. Nun wird die vom Casein noch festgehaltene Luft durch vorsichtiges Evakuieren (vom Gaszuleitungsrohr her) entfernt. Das Schäumen der Mischung bekämpft man dadurch, dass man durch den kleineren Tropftrichter noch etwas Amylalkohol zugibt. Nun wird das Gefäss durch das Gaszuleitungsrohr mit luftfreiem Kohlendioxyd (aus einem *Kipp*) gefüllt. Jetzt lässt man durch den grösseren Tropftrichter 5 cm³ Eisessig einfliessen, worauf man nochmals kurz evakuiert und wieder mit Kohlendioxyd auffüllt. Am kapillaren Gasableitungsrohr angeschlossen war bereits eine mit Zweiweghahn und Niveaugefäss versehene Gasbürette, die als Sperrflüssigkeit 1-proz. Schwefelsäure enthält. Der bisher geschlossene Zweiweghahn wird nun so gedreht, dass Reaktionsgefäss und Gasbürette miteinander verbunden sind. Jetzt lässt man durch den grösseren Trichter tropfenweise eine ausgekochte Lösung von 3 g Natriumnitrit in 10 cm³ Wasser zufliessen. Die Gasentwicklung setzt sofort ein. Zu starkes Schäumen wird durch weitere Zugabe von Amylalkohol bekämpft. Die Zeit, zu der das Nitrit zugesetzt wird, ist zu notieren. Eine Stunde nach Zugabe des Nitrits wird der entwickelte Stickstoff zum erstenmal gemessen. Das Gasgemisch (N_2, NO und NO_2) wird durch den Zweiweghahn in eine Absorptionspipette nach *Hempel* getrieben. Diese enthält 10-proz. Natronlauge, die mit Kaliumpermanganat gesättigt ist. Das Reaktionsgefäss wird zweimal mit 50 cm³ Kohlendioxyd ausgespült und auch dieses Gasvolumen in die Pipette getrieben. Die Absorption und die Messung des verbleibenden Stickstoffes müssen rasch vor sich gehen, damit im Reaktionsgefäss inzwischen kein zu grosser Überdruck entsteht. Man nimmt nun eine Zeitkurve der *van Slyke*-Reaktion auf, indem man während ca. 4 Stunden alle 30 bis 40 Minuten den entwickelten Stickstoff misst. Dies ist nötig, weil die Reaktion nie zu einem Ende kommt. Die Zeitkurven der Stickstoffentwicklung haben alle dieselbe Form (I), wie sie in Fig. 1 wiedergegeben ist. Man erkennt deutlich.

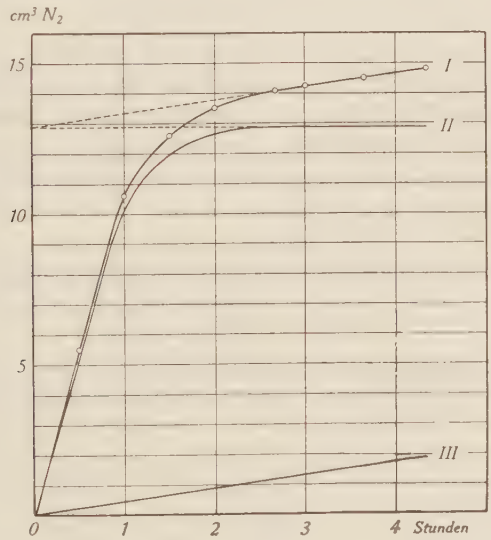


Fig. 1.

dass sich zwei Reaktionen überlagern, eine rasch beginnende und nach 2 bis 3 Stunden beendete Reaktion (II) und eine andere, langsame, deren Kurve (III) linear mit der Zeit verläuft. Bei der letzteren dürfte es sich um eine Umsetzung mit den Peptidgruppen

handeln[1]). Der Schnittpunkt des linearen Kurvenstückes mit der Ordinate ergibt den Endwert der rasch verlaufenden Reaktion der salpetrigen Säure mit den freien Lysinaminogruppen. Unter Verwendung dieser graphisch ermittelten Stickstoffvolumina lassen sich die *van Slyke*-Werte mit einer Genauigkeit von $\pm 1\%$ reproduzieren.

Zusammenfassung.

Es wurde festgestellt, dass bei der Einwirkung von Formaldehyd auf Casein bei p_H 5—6 und Zimmertemperatur in erster Linie die freien ε-Aminogruppen des Lysins in Reaktion treten.

Aus dem Vergleich des Formaldehydbindungsvermögens von desaminiertem und gewöhnlichem Casein und aus der Verminderung des *van Slyke*-Stickstoffes bei der Formaldehydgerbung ist zu schliessen, dass sich die freien Lysinaminogruppen mit dem Formaldehyd im Verhältnis 1 : 1 verbinden. Es konnte erstmals einwandfrei nachgewiesen werden, dass bei der Reaktion zwischen Formaldehyd und Casein Wasser abgespalten wird. Die kondensierte Wassermenge wurde als äquivalent dem durch die Lysinaminogruppen gebundenen Formaldehyd gefunden. Schliesslich konnte erneut gezeigt werden, dass ausser den Lysinaminogruppen noch andere Gruppen im Casein vorhanden sind, die schon in schwach saurem Medium Formaldehyd binden. Eine Reihe von Gründen sprechen dafür, dass es sich dabei vor allem um die Peptidgruppen handeln muss. Die Reaktion zwischen den Peptidgruppen und dem Formaldehyd ist aber mindestens in der Kälte mit keiner Kondensation verbunden.

Die mitgeteilten Versuche führen zum Schluss, dass die eigentliche Gerbwirkung des Formaldehyds (Verlust der Löslichkeit, Verminderung der Quellfähigkeit) dadurch zustande kommt, dass zwischen den freien Lysinaminogruppen einerseits und den Peptidgruppen andererseits Methylenbrücken gebildet werden, was eine hauptvalenzmässige Verknüpfung der Proteinmolekeln untereinander bedeutet.

Bern, Chemisches Institut der Universität,
Organische Abteilung.

[1]) Es ist auch von gewissen einfachen Peptiden bekannt, dass sie mehr Stickstoff entwickeln als den freien NH_2-Gruppen entspricht. Siehe *Houben-Weyl*, loc. cit.

Lebenslauf

Am 22. August 1915 wurde ich, Hans Samuel Hadorn, in Forst bei Thun geboren. Ich besuchte vier Jahre die Primarschule in Forst, dann fünf Jahre die Sekundarschule in Wattenwil. Im Frühling 1931 trat ich in das Kant. Technikum Burgdorf, Abteilung für Chemie, ein. Im Herbst 1933 erwarb ich mir das Diplom als Chemiker. Während drei Jahren war ich in der Praxis tätig. Im Herbst 1936 begann ich das Studium an der Berner Hochschule, welches jedoch mehrmals durch Militärdienst oder Praxis unterbrochen wurde.